

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**İNSAN SEMEN KRİYOPREZERVASYONUNDA KOENZİM Q10
VE KURKUMİNİN SPERMATOZOON MORFOLOJİSİNE VE
FONKSİYONUNA ETKİLERİ**

DR. DERYA ÖZDEMİR TAŞ

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
PROF. DR. ESRA ERDEMLİ**

**ANKARA
2019**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**İNSAN SEMEN KRİYOPREZERVASYONUNDA KOENZİM Q10
VE KURKUMİNİN SPERMATOZOON MORFOLOJİSİNE VE
FONKSİYONUNA ETKİLERİ**

DR. DERYA ÖZDEMİR TAŞ

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
PROF. DR. ESRA ERDEMLİ**

**Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından
18L0230011 Proje numarası ile desteklenmiştir**

ANKARA

2019

KABUL ONAY

Düzenleme tarihi: 24/12/2014

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN	
Adı, Soyadı	: Derya ÖZDEMİR TAŞ
Anabilim/Bilim Dalı	: Histoloji ve Embriyoloji ABD
Tez Danışmanı	: Prof. Dr. Esra ERDEMLİ
Sınav tarihi: 23 / 07 / 2019	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER	
Tezin Başlığı: İnsan semen kriyoprezervasyonunda koenzim Q10 ve kurkuminin spermatozoon morfolojisine ve fonksiyonuna etkileri	
Tezin Niteliği:	☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi ☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi
Kaçıncı tez sınavı olduğu:	☒ 1 ☐ 2 ☐ 3

III. KARAR	
Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak	
☒ Kabulüne	
☐ Reddine	
☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine	
☒ Oy birliği ☐ Oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

IV. AÇIKLAMALAR	
Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız	
Tezin uygun olduğuna ve kabulüne oy birliğiyle karar verilmiştir	

Jüri Başkanı

Prof.Dr. Esra ERDEMLİ

Ankara Üniv. Histoloji ve Embriyoloji
Anabilim/Bilim Dalı

Jüri Üyesi

Prof.Dr. Sevda MÜFTÜOĞLU

Hacettepe Üniv. Histoloji ve Embriyoloji
Anabilim/Bilim Dalı

Jüri Üyesi

Prof.Dr. Özgür ÇINAR

Ankara Üniv. Histoloji ve Embriyoloji
Anabilim/Bilim Dalı

ÖNSÖZ

Bu çalışmada insan semen kriyoprezervasyonunda antioksidan maddeler olan koenzim Q10 ve kurkuminin spermatozoonlar üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Kriyoprezervasyon işlemi tüm biyolojik aktiviteyi durdurmak ve gelecekteki kullanımları için onları korumak adına, hücrelerin ve dokuların sıfırın altındaki sıcaklıklara soğutulması anlamına gelmektedir. Koenzim Q10 ve kurkuminin hücrede farklı mekanizmalarla antioksidan özellik taşımaları nedeniyle birlikte de dondurma mediumlarına ilave edilip daha etkin bir koruyucu yöntem olup olmayacağı araştırmanın amacıdır. Bu çalışmada;

Uzmanlık eğitimim boyunca engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle desteğini esirgemeyen değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Esra Erdemli'ye,

Ankara Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji ABD Başkanı Sayın Prof. Dr. Alp Can'a, bölümümüz öğretim üyelerinden Prof. Dr. Belgin Can, Prof. Dr. Bizden Sabuncuoğlu, Prof. Dr. Sevim Aydın, Prof. Dr. Oya Evirgen, Prof. Dr. Özgür Çınar, Doç. Dr. İ. Sinan Özkavukcu, Doç. Dr. Deniz Billur, Öğretim Görevlisi Dr. Ferda Topal Çelikkan'a, Bu süreçte yanımda olan bölümümüzün asistanlarından Uzman Dr. Ebru Çelik, Araş. Gör. İrem İnanç, Doktora Öğrencisi Selda Kahveci Hayme ve Fatma Alaoğlu, Araş. Gör. Gökçen Gökçe, Yüksek Lisans Öğrenci Ceren Mungan ve Özge Akduman'a ve bölümümüz personeli Serap Batı, Abdülkerim Dilbaz, Remzi Ata, Erdoğan Çalışkan'a,

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Doğum Hastalıkları Tüp Bebek Merkezi Kliniği personellerine,

Tez çalışmamı 18L0230011 numaralı projeyle destekleyen Ankara Üniversitesi BAP'a,

Son olarak, eğitimimin her aşamasında maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme ve sevgili eşim İsmail Melik Taş'a sonsuz teşekkür ederim.

Derya Özdemir Taş

2019

İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Spermatogenez	3
2.1.1. Giriş.....	3
2.1.2. Spermatogonyal Faz:.....	3
2.1.3. Spermatosit Fazı (Mayoz):	4
2.1.4. Spermatid Fazı (Spermiyogenez)	6
2.2. Spermatozoonun Yapısı	8
2.2.1. Spermatozoon Baş Yapısı	8
2.2.2. Spermatozoonun Kuyruk Yapısı	8
2.3. Spermatozoon İnceleme Yöntemleri	10
2.3.1. Semen Analizi	10
2.3.2. Semen Analizi Normal Değerleri	13
2.3.3. Spermatozoon Anomalileri	16
2.4. Kriyoprezervasyon	19
2.4.1. Giriş.....	19
2.4.2. Kriyoprotektan Ajanlar	19
2.4.3. Kriyoprezervasyon Yöntemleri	20
2.4.4. Kriyoprezervasyon Saklama Yöntemleri	21
2.4.5. Spermatozoon Kriyoprezervasyonu	21
2.4.6. Spermatozoon Kriyoprezervasyonda Hasar Oluşumu	22
2.5. Spermatozoon Kriyoprezervasyonunda Antioksidan Maddeler.....	24
2.5.1. Koenzim Q10	24
2.5.2. Koenzim Q10 ve Erkek İnfertilitesi	25

2.5.3. Kurkumin	26
2.5.4. Kurkumin ve Erkek İnfertilitesi	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1. Gereç	29
3.1.1. Spermatozoon Kriyoprezervasyonu	29
3.1.2. CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis - Bilgisayar Destekli Semen Analiz Sistemi)	30
3.1.3. Histolojik Eozin-Nigrosin Boyama	30
3.1.4. Propidium Iodide (PI) Boyama - İmmunfloresan Mikroskobu	30
3.1.5. Propidium Iodide (PI) Boyama - Akım Sitometrisi	31
3.1.6. Peanut Agglutinin (PNA) Boyama - İmmunfloresan Mikroskobu	31
3.1.7. Peanut Agglutinin (PNA) Boyama – Akım Sitometrisi	31
3.1.8. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Transferase Mediated Nick End-Labeling (Tunel) Boyama - İmmunfloresan Mikroskobu ...	32
3.1.9. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Transferase Mediated Nick End-Labeling (Tunel) Boyama - Akım Sitometrisi	32
3.1.10. Biyokimyasal TAS (Total Antioksidan Seviyesi) ve TOS (Total Oksidan Seviyesi) Ölçümü	33
3.2. Yöntem	33
3.2.1. Ön Deneyler	33
3.2.2. Deneyler	37
4. BULGULAR	44
4.1. Ön Deneyler:	44
4.1.1. CASA	44
4.1.2. Eozin Nigrosin Boyama	45
4.2. Deneyler	47
4.2.1. CASA	47
4.2.1. Propidium Iodide (PI) İmmunfloresan İşaretlenmesi ve Akım Sitometrisi Analizi	48
4.2.2. PNA İmmunfloresan İşaretlenmesi ve Akım Sitometrisi Analizi	50
4.2.3. TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick end Labeling) İmmunfloresan İşaretlenmesi ve Akım Sitometrisi Analizi..	52

4.2.4. Total Antioksidan Seviyesi (TAS) – Total Oksidan Seviyesi (TOS)	
Analizi.....	54
5. TARTIŞMA	56
6. SONUÇLAR	63
ÖZET.....	65
SUMMARY	66
KAYNAKLAR	67



SİMGELER KISALTMALAR DİZİNİ

cm	Santimetre
Da	Dalton
Equiv	Equivalent
g	Gravite
hz	Hertz
kg	Kilogram
L	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
mmol	Milimol
RPM	Revolutions Per Minute
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol
°C	Santigrat – Derece

Kısaltmalar

ATP	Adenozin Trifosfat
CASA	Computer-Assisted Sperm Analysis
CoQ10	Koenzim Q10
CO ₂	Karbondioksit
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EG	Etilen Glikol
ETZ	Elektron Taşıma Zinciri
FDA	Food and Drug Administration
G	Gliserol

HE	Hematoksilin Eozin
IB	İmmunobead
IB	İndirekt immunobead
IM	İmmotilite
KPA	Kriyoprotektan
MAR	Mixed Antiglobulin Reaction
MI	Metafaz I
MII	Metafaz II
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NP	Nonprogresif
OS	Oksidatif Stres
PAS	Periyodik asit - schiff
PBS	Phosphate Buffer Saline
PFA	Paraformaldehit
PI	Propidium Iodide
PNA	Peanut agglutinin
PR	Progresif
PUFA	Çoklu Doymamış Yağ Asidi
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türeleri
SFM	Sperm Freezing Medium
TAS	Total Antioxidant Status
TOS	Total Oxidant Status
TUNEL	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Transferase Mediated Nick End-Labeling
VAR	Varikosel
YÜT	Yardımla Üreme Teknikleri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Spermatogenezis diyagramı.	6
Şekil 2.2.	İnsan spermatozoonunun diyagramı.....	10
Şekil 2.3.	Spermatozoon anormallikleri	18
Şekil 4.1.	Spermatozoonların dondurma çözme sonrası eosin-nigrosin boyanması.....	46
Şekil 4.2.	Çözme sonrası PI boyası floresan mikroskopi görüntüsü	48
Şekil 4.3.	Çözme sonrası PI boyası akım sitometrisi görüntüsü.	49
Şekil 4.4.	Çözme sonrası PI boyası akım sitometrisi median değerleri.	50
Şekil 4.5.	Çözme sonrası PNA boyası immunfloresan görüntüsü.	50
Şekil 4.6.	Çözme sonrası PNA boyası akım sitometri görüntüsü.	51
Şekil 4.7.	Çözme sonrası PNA boyası akım sitometri median değerleri.....	52
Şekil 4.8.	Çözme sonrası TUNEL boyası immunfloresan görüntüsü.	53
Şekil 4.9.	Çözme sonrası TUNEL boyası akım sitometri görüntüsü.	53
Şekil 4.10.	Çözme sonrası TUNEL boyası akım sitometri median değerleri.	54
Şekil 4.11.	Çözme sonrası TAS, TOS ve OSİ median değerleri.....	55
Şekil 5.1.	Elektron taşıma sistemi.	59

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 4.1.	Spermatozoon Hareketlilik Parametreleri.....	45
Tablo 4.2.	Spermatozoonların dondurma çözme sonrası canlılık yüzdeleri	46
Tablo 4.3.	Spermatozoonların dondurma çözme sonrası CASA parametrelerinin median değerleri.....	47
Tablo 5.1.	Deney Sonuçları.....	57



1. GİRİŞ

Yardımla üreme teknikleri (YÜT), geleneksel tedavi yöntemlerinin başarısız olduğu çiftlerde gebelik elde edebilmek için uygulanan tedavi yöntemlerinin tümünü kapsar. Üreme teknolojisindeki hızlı gelişmeler, bilim adamlarının uzun yıllardır çalıştığı YÜT tedavilerinde önemli ilerlemeler kaydedilmesini sağlamıştır. Özel birtakım kimyasallar (kriyoprotektan) yardımı ile yapılan biyolojik materyallerin dondurulması işlemi olan kriyoprezervasyon (soğuktan koruma yöntemi) bu önemli gelişmelerden biri olarak öne çıkar.

Günümüzde infertilite nedenlerinin %40-50'sinin erkek faktörüne bağlı olduğu bilinmektedir. Erkek infertilitesine çözüm arayışları YÜT kliniklerinde devam etmekle birlikte, henüz istenen gebelik başarıları elde edilememiştir. 1949 yılında ilk spermatozoon hücresinin dondurulmasından sonra, donör programlarının spermatozoon dondurulmasını zorunlu hale getirmesi bu konu üzerindeki araştırmaları artırmıştır. Spermatozoonların dondurulup saklanması yardımla üreme tedavilerindeki başarıyı arttırmış ve erkeklerin gelecekteki fertilitelerini korumaları (testis cerrahisi öncesi, kemoterapi veya radyoterapi öncesi vs.) adına da katkı sağlamıştır.

Spermatozoonların kriyoprezervasyon işleminde hücrelerin, yapısal ve fonksiyonel işlevlerinin zarar görmemesi ve döllenme yeteneklerinin korunması asıl amaçtır. Başarılı bir kriyoprezervasyon uygulaması için spermatozoon hücre sitoplazmasının kristalleşme özelliği göz önüne alınmalı ve hücrelerde dondurma evresine kadar dehidratasyon işlemi yapılmalıdır. Hücre içindeki buz kristallerinin oluşmasını önlemek adına dondurma işlemi için kullanılan koruyucu maddeler (kriyoprotektanlar) çok yavaş ve mekanik olarak karıştırarak uygulanır. Buna rağmen kriyoprezervasyonu yapılmak istenen spermatozoon hücrelerinin yapısında ve fonksiyonunda zararlı değişiklikler meydana gelmektedir. Bu istenmeyen değişiklikler hücrelerin hareketliliklerindeki azalma, morfolojik değişiklik, membranlarındaki bütünlük ve akışkanlıklarındaki bozulma, DNA'daki hasarlar, organellerdeki fonksiyon kayıpları gibi özetlenebilir. Bu değişikliklere, soğuk şok uygulaması, buz kristali oluşumu, ozmotik değişiklikler, oksidatif stres gibi durumlar neden olur.

Memeli semen sıvısı normal şartlar altında antioksidan enzim ve maddeleri içerir, ancak bu endojen antioksidan maddeler, dondurma-çözme sırasında oluşan oksidatif değişikliklere karşı yeterli koruyucu etki gösteremez. Bu nedenle son yıllarda kriyoprezervasyon işleminde kriyoprotektanların (KPA) kullanılmasının yanında farklı antioksidan maddeler de denenmiştir. Kriyoprezervasyon işlemindeki hasar mekanizmalarının daha iyi aydınlatılması, KPA'larla birlikte hangi antioksidan maddelerin kullanılmasının oluşacak bu hasarı en az seviyeye indirebilirliği yönündeki araştırmalar hızla devam etmektedir. Bu maddelerin bulunmasının yanında kullanılacak antioksidan miktarının da ne kadar olduğu ve hangi hasar mekanizmalarını düzelterek hücrede meydana gelebilecek zararlı değişiklikleri önlediğine dair kesin bir bilgi yoktur.

Bizde çalışmamızda, insan spermatozoon kriyoprezervasyon işlemi sırasında literatürde antioksidan maddeler olarak sunulan kurkumin ve koenzim Q10'u kullanmayı, bu maddelerin kriyoprezervasyon işleminde, hasar giderici etkilerinin olup olmadığını ve var ise uygun dozları göstermeyi amaçladık. Spermatozoonlarda oluşacak; canlılık, hareketlilik, akrozom bütünlüğü, apoptozis ve DNA hasarı, hücrelerdeki total antioksidan ve oksidan miktarları gibi değişikliklerin belirlenmesi ile pratik kullanımda bu antioksidanların KPA'lar içinde yer alması için öncü bir çalışma olmasını ve literatüre katkı sağlamayı amaçladık.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Spermatogenez

2.1.1. Giriş

Spermatozoonların oluşumu spermatogenez adı verilen karmaşık bir olaylar serisiyle gerçekleşir. Puberteden kısa bir süre önce, hipofiz bezinden salgılanan gonadotropin seviyelerinin artmasının etkisiyle başlar ve yaşam boyu devam eder (Pawlina, 2016).

Primordial germ hücreleri, fetal hayatın çok erken dönemlerinde vitellus kesesinin allantoise yakın bölümünde endoderm hücreleri arasında görülür ve epiblast kökenlidir. Gebeliğin beşinci haftasından itibaren hücreler genital kabartıya doğru göç etmeye başlar ve altıncı haftada büyük oranda bu bölgeye ulaşmış olurlar. Seminifer tübülüslerin sölom epiteli hücrelerinden oluşumunu takiben de germ hücreleri gonodosit adının alır.

Seminifer tübülüslerin bazal kısımlarına yerleşen primordial germ hücreleri spermatogonyum ismini alır. Pubertenin başlamasına yakın seminifer tübülüsler kanalize olmaya ve spermatogonyumlardaki mitotik aktivite artmaya başlar (Çelik, 2011). Mitotik aktivitenin başlamasıyla birlikte tanımlayıcı olarak spermatozoon oluşumu üç farklı faza ayrılır:

2.1.2. Spermatogonyal Faz:

Kök hücreler bölünerek kendi yerlerine geçecek olan hücreleri ve spermatogonyum popülasyonunu oluşturur. Artan bölünme süreciyle birlikte spermatogonyal hücreler rutin HE (Hematoksilin Eozin) preparatlarında çekirdek şekli ve kondansasyonunda farklılık gösteren üreme hücrelerini üretir.

Tip A koyu spermatogonyumlar, mitotik olarak inaktif hücreleri temsil eder. Yoğun bazofilik ve oval nükleuslara sahiptir. Seminifer epitelin kök hücreleri

oldukları düşünülmektedir. Düzensiz aralıklarla bölünerek ya tip A koyu spermatogonyumları ya da tip A açık spermatogonyumları oluştururlar.

Tip A açık spermatogonyumlar, soluk boyanan bir çekirdeğe, küresel mitokondriyonlar, küçük bir golgi kompleksi ve çok sayıda serbest ribozoma sahiptir. Artmış mitotik aktivite gösterip aynı tip daha fazla hücre veya tip B spermatogonyumları oluşturur.

Tip B spermatogonyumlar, genel olarak çekirdek zarı boyunca ve merkezi bir çekirdekçiğin çevresinde geniş kümeler oluşturacak şekilde yoğunlaşmış kromatini bulunan yuvarlak çekirdeğe sahip hücrelerdir. Bu spermatogonyumlar mitoz girerek primer spermatozoonları oluşturur.

Bir tip A koyu spermatogonyumunun iki tip A açık spermatogonyuma bölünmesinin farklı bir özelliği, kardeş hücrelerin ince bir sitoplazmik köprü ile birbirine bağlı kalmasıdır. Bu durum, tip A açık spermatogonyumlarının soyu boyunca ardışık her mitotik bölünmede ortaya çıkmaktadır. Bu şekilde başlangıçtaki tip A açık spermatogonyum çiftinin tüm soyu bir dizi şeklinde bağlantılı hale gelir. Bu sitoplazmik bağlantılar spermatid maturasyonunun son evrelerine kadar bozulmadan kalır ve ana açık hücrelerden gelen tüm hücreler senkronize olarak gelişir.

Birkaç mitotik bölünmeden sonra, tip A spermatogonyumlar tip B spermatogonyumlara farklılaşır. Spermatogonal fazdaki son olay tip B spermatogonyumların görünümü olarak kabul edilir.

2.1.3. Spermatosit Fazı (Mayoz):

Primer spermatositler mayoz bölünmeye girerek hem kromozom sayılarını hem de DNA miktarını yarıya indirir.

Mitotik bölünmelerle sayılarını arttıran B spermatogonyumlar primer spermatositleri oluşturur. Primer spermatositler mayotik aktiviteye başlamadan önce DNA'larını eşler. Bu durumda normal sayıda kromozom ($2n$), iki katı miktarda da DNA ($4d$) içerir. Homolog kromozomların iki kardeş kromatidden oluşması nedeniyle DNA miktarı $4d$ 'dir.

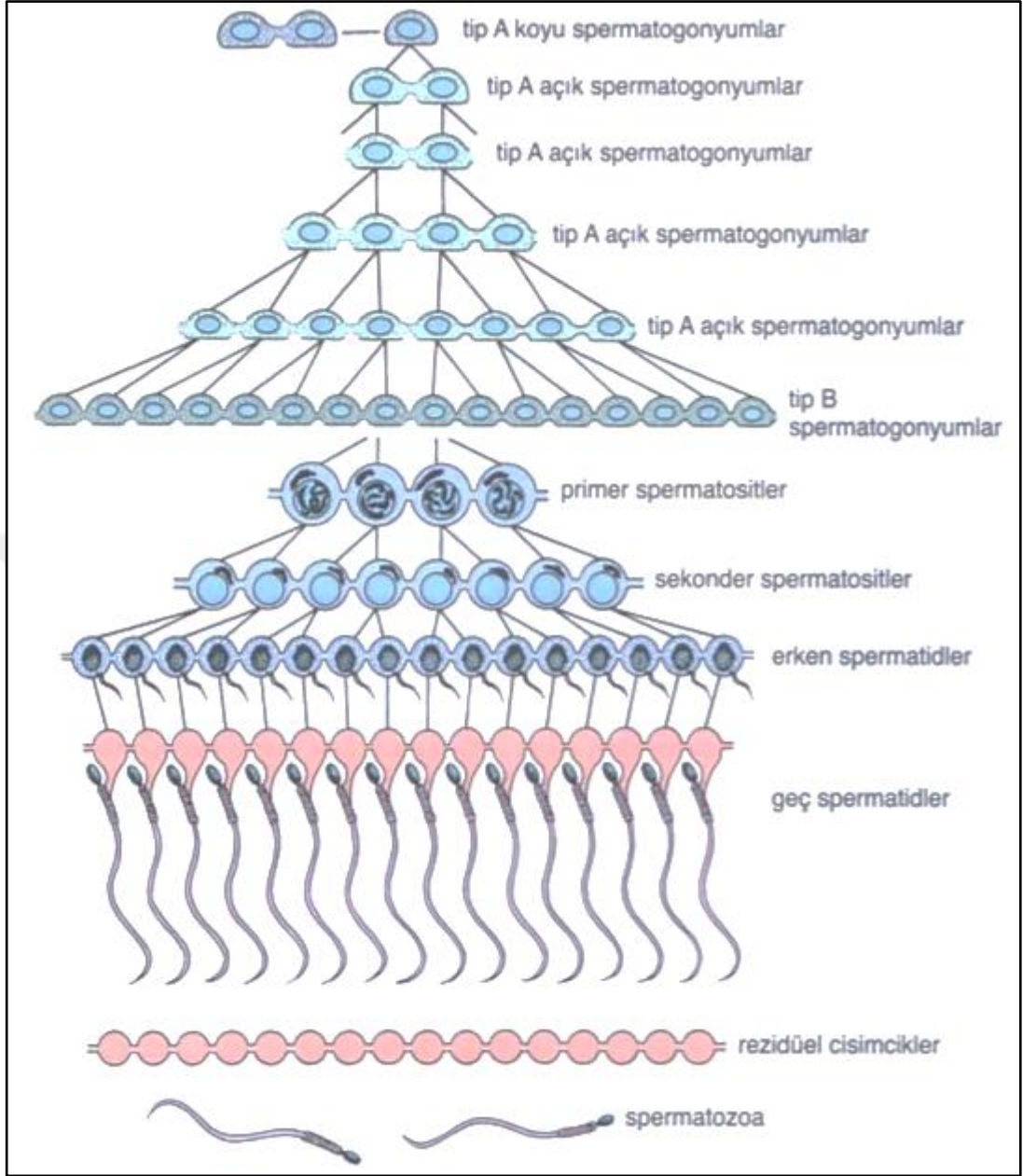
Mayoz I, kromozom ve DNA miktarının yarıya indiği aşamadır, bu nedenle sekonder spermatosit haploid kromozom ($1n$) ve $2d$ miktarda DNA'ya sahiptir. Mayoz II'den önce DNA eşleşmesi olmadığından, bu bölünmeden sonra haploid ($1n$) sayıda kromozom ve tek bir kromatid ($1d$) sayıda DNA'ya sahip hücreler oluşur.

İnsan primer spermatositlerinde 22 gün süren birinci mayotik bölünmenin profazında kromatinler yoğunlaşır. Profazın sonunda X, Y ve otozomların her biri iki kromatin ipliği şeklinde fark edilebilir. Homolog kromozom çiftleri metafaz plağı boyunca dizilerek eşleşirler.

Tetrad yapısını oluşturan homolog kromozomlar, crossing-over sürecinde genetik materyal değişimi yapar. Bu değişim sırasında sinaptonemal kompleks olarak isimlendirilen üç parçalı yapı şeklinde dört kromatid yeniden düzenlenir. Bu evre genetik çeşitliliğin gerçekleştiği basamaktır. Oluşan her spermatid bu evredeki değişimden dolayı birbirinden farklı bir yapı kazanır. Homolog kromozomlar crossing-overın tamamlanmasıyla birbirinden ayrılır ve mayoz mekiği zıt kutuplara çekilerek tekrar diad yapılarını oluşturur.

Homolog kromozom çiftlerinin mekik üzerindeki hareketi rastgele gerçekleşir ve spermatozoonların genetik çeşitliliğinin bir diğer kaynağını oluşturur.

Birinci mayotik bölünmenin sonunda sekonder spermatosit olarak adlandırılan hücreler oluşur. Bu hücreler tekrar DNA replikasyonu gerçekleştirmeden mayotik bölünmesini sürdürerek profaz aşamasına girer. Her sekonder spermatosit bir X, bir Y ve 22 otozoma sahip iki kardeş kromatidden oluşur. DNA miktarı hala diploiddir. İkinci mayotik bölünmenin metafaz aşamasında kromozomlar orta hat boyunca dizilir. Daha sonra kardeş kromatidler ayrılarak zıt kutuplara çekilirler. İkinci mayotik bölünmenin tamamlanmasıyla birlikte nükleer membranlar tekrar oluşur. Sekonder spermatositlerin her birinde 23 kromozom ($1n$) ve $1d$ miktarında DNA içeren spermatid hücreleri oluşur (Şekil 2.1.) (Pawlina, 2016).



Şekil 2.1. Spermatogenezis diyagramı

2.1.4. Spermatid Fazı (Spermiyogenez)

Seminifer tübül lümenine yakın adluminal kompartmanda haploid spermatidler yerleşmiştir. Sertoli hücresinin kriptalarında (plazma membranının oluşturduğu çukurcuklar) özelleşmiş bağlantılar ile tutunmuş haldedirler. Spermatidler spermatogenezin son basamağı olan spermiyogenez aşamasında metamorfoza uğrayarak şekil değiştirir. Spermiyogenez üç ana olay karakterize eder:

1. Flagellumun (kamçı) gelişmesi: Distal sentriolden gelişir. Fibröz kılıf ile çevrili aksonem (eşmerkezli diziliimli 9+2 mikrotübül çiftleri) ve keratin içerikli dış yoğun liflere sahiptir. Kuyruğun proksimal bölümü (orta parça) çevresinde mitokondriyonlar sarmalimsi bir kılıf oluşturur.

2. Akrozom gelişmesi: Akrozomal kese, döllenme için gerekli olan hidrolitik enzimlerin depolanmasının ve sürekli sentezinin gerçekleştiği kısımdır. Akrozomun gelişmesi golgi evresi, kep/şapka evresi, akrozomal evre ve olgunlaşma evresinden oluşur.

Golgi evresi: Bu evre, golgi kompleksinde kümelenen periyodik asit - schiff (PAS) pozitif granüllerin spermatidlerde görülmesiyle karakterizedir. Glikoprotein bakımından zengin olan bu granüller; akrozomal vezikül olarak adlandırılan, nükleer zarfa yakın membranla sınırlandırılmış bir vezikül oluşturmak üzere bir araya gelir. Preakrozomal veziküller birleşerek akrozomu oluşturmak üzere içeriklerinin artırır ve genişler. Bu vezikülün pozisyonu gelişmekte olan spermatozoonun ön kutbunu belirler.

Kep/şapka evresi: Akrozomal vezikül bu evrede, spermatozoon nükleusunun ön yarısı üzerinde yayılır. Oluşan bu yapı akrozomal kep olarak adlandırılır. Kepin altındaki nükleer zarf kısmı porlarını kaybeder ve kalınlaşır. Nükleer içerik yoğunlaşmaya başlar.

Akrozom evresi: Bu evrede spermatid Sertoli hücrelerinin içine doğru iyice gömülür ve yeniden konumlanarak bazal laminaya doğru yönelir. Spermatidin yoğunlaşan nükleusu yassılaşır ve uzar. Spermatidin sitoplazması posteriyora doğru yer değiştirir. Nükleus ve çevresindeki akrozom plazma membranının ön kısmına doğru taşınır.

Olgunlaşma evresi: Bu evrede spermatidin flagellum etrafındaki fazla sitoplazma azaltılır ve olgun bir spermatozoon oluşur. Rezidüel cisimcik denilen fazla sitoplazma Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Hücreler arası köprüler rezidüel cisimlerde kalarak spermatidlerin bağlantısı kopar ve Sertoli hücrelerinden salınırlar.

3. Nükleer yoğunlaşma: Arginin ve lizinden zengin protaminlerle somatik histonlar yer değiştirerek nükleer yoğunlaşma gerçekleşir. Histonların protaminlere dönüşümünden sonra düz kromatin lifler çekirdek materyalini yoğunlaştırmak için yan yana dizilir ve nükleozomlar kaybolur. Bu aşamadan sonra artık belirgin bir RNA (Ribonükleik asit) sentezi yoktur.

Spermiyogenez tamamlanırken spermatozoon seminifer tübülün lümenine salıverilir (Pawlina, 2016, Kierszenbaum, 2002).

2.2. Spermatozoonun Yapısı

2.2.1. Spermatozoon Baş Yapısı

Spermatozoonun yassılaştırmış başı yaklaşık 4,5 µm uzunluğunda, 3 µm genişliğinde ve 1 µm kalınlığında olup plazmalemma ile çevrelenmiştir. 23 çift kromozomun (22 otozom + Y kromozomu veya 22 otozom + X kromozomu) sadece bir tanesi elektron-yoğun çekirdeği ile kaplıdır ve akrozom, kısmen nükleusun ön yüzünü çevreler. Akrozom, spermatozoonun ön kısmında hücre membranı ile temas eder. Nöraminidaz, hiyalüronidaz, asit fosfataz, aril sülfataz ve akrosin olarak bilinen tripsin benzeri proteaz dahil olmak üzere çeşitli enzimleri içerir.

Spermatozoonun, ovosit zona pellusidasında bulunan ZP3 molekülüne bağlanması, akrozomal reaksiyonu tetikler, spermatozoonun ovosite ulaşması için akrozomal enzimler salınır ve ovositin çevresindeki duvar geçer, böylece döllenme işlemi kolaylaşır. Akrozomal reaksiyonla birlikte başka spermatozoonların ovuma girmesi önlenmiş olur.

2.2.2. Spermatozoonun Kuyruk Yapısı

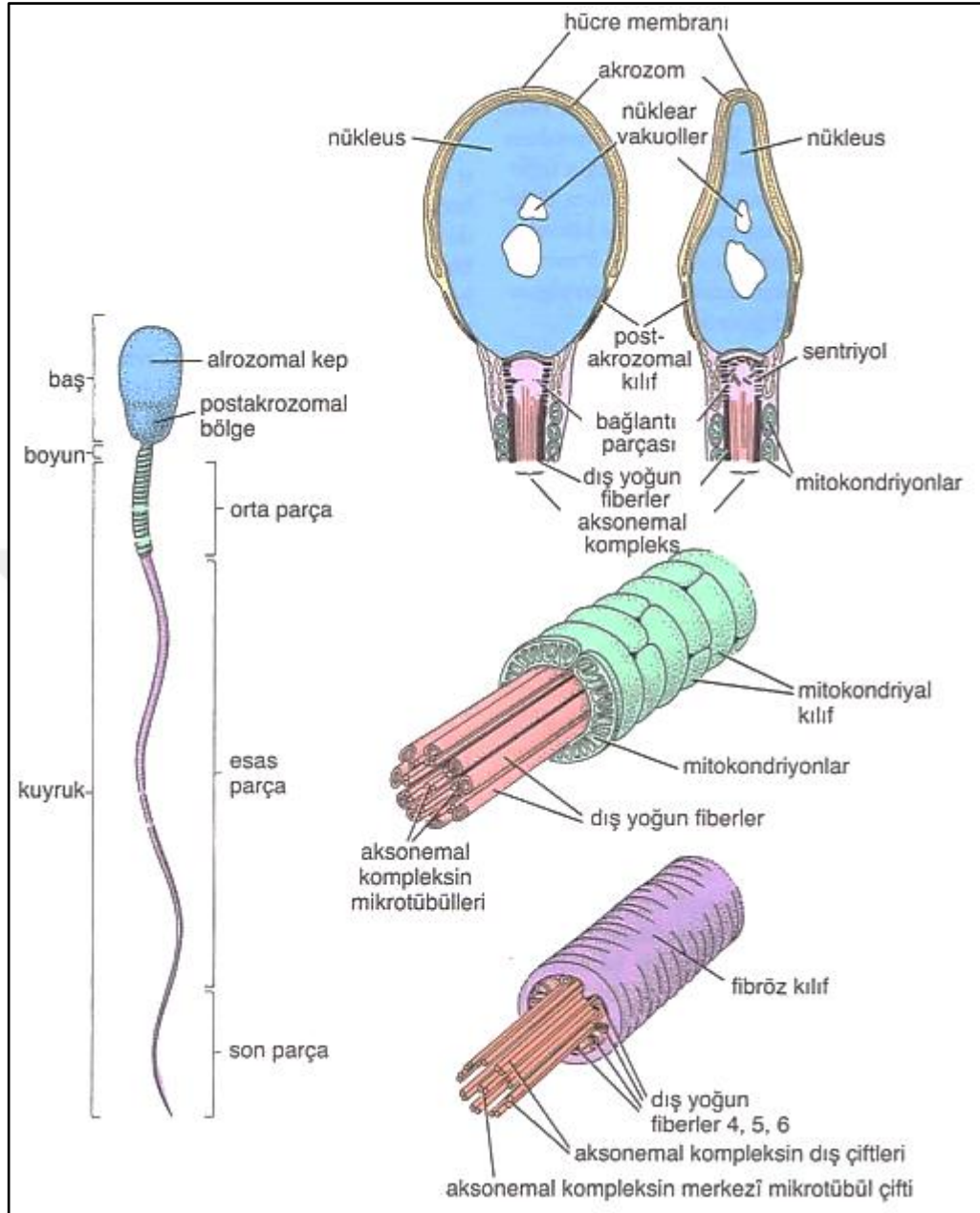
Spermatozoonun kuyruğu dört bölgeye ayrılır: boyun, orta parça, esas parça ve son parça. Başın plazmalemması kuyruğun plazma membranı ile süreklidir.

Boyun (~5 µm uzunluğunda) kuyruğun geri kalanına başı bağlar. İki sentriyolü çevreleyen bağlantı parçasının dokuz kolonun silindirik düzeninden oluşur. Kolumnar yoğunlukların arka yüzleri, dokuz dış yoğun lifler ile sürekli dir.

Orta parça (~5 µm uzunluğunda) boyun ve esas parça arasında yer almaktadır. Dış yoğun lifleri ve merkezi aksonemi çevreleyen mitokondriyal kılıfın varlığı ile karakterizedir. Orta parça, plazmalemmaya yapışık yuvarlak yoğun bir yapı olarak anulusta durur ve böylece mitokondriyal kılıfın baş kısmından kuyruğa doğru hareket etmesini önler. Ayrıca, dokuz dış yoğun lifin ikisi, halkada sonlanır; kalan yedi esas parçada da devam eder.

Esas parça (~45 µm uzunluğunda) kuyruğun en uzun segmentidir ve anulustan son parçaya kadar uzanır. Esas parçanın aksonemi, orta parçanın kiyle sürekli dir. Aksonemi çevreleyen, orta parçanın kilerle sürekli olan ve fibröz kılıf tarafından çevrelenen yedi dış yoğun lif içerir.

Son parça (~5 µm uzun), plazmalemma ile çevrili merkezi aksonemden oluşur. Aksonem, son 0.5 ile 1.0 µm'de dağınıktır, burada dokuz çift ve iki tekli yerine, rastgele düzenlenmiş, ayrı ayrı mikrotübüller belirgindir (Şek. 2.2.) (Pawlina, 2016, Lislie P. Gartner, 2007).



Şekil 2.2. İnsan spermatozoonunun diyagramı

2.3. Spermatozoon İnceleme Yöntemleri

2.3.1. Semen Analizi

Sağ ve sol epididimde depolanan konsantre spermatozoon süspansiyonu, üremeye yardımcı bezlerin salgılarıyla karışır ve seyreltilerek ejakulasyon sırasında semen (meni) adıyla dışarı verilir. Semen haciminin yaklaşık % 90'ını üremeye

yardımcı bezler, esas olarak prostat ve seminal bezden ve az miktarlarda da bulbouretral bezler (Cowper bezi) ve epididimlerden gelen salgılar oluşturur. Semen sıvısında spermatozoa sayısı ve bezlerden sağlanan toplam sıvı hacmi ölçülebilir. Spermatozoanın morfolojisi, canlılığı (viabilite), hareketliliği (motilite) ve seminal sıvının bileşimi fonksiyonu için önemlidir.

Laboratuvar ortamında ejakülatın hepsi bir kapta toplanır ve spermatozoa seminal bez kaynaklı proteinlerin oluşturduğu bir koagulum içine hapsolür. Bu koagulum, daha sonra prostatik proteazlar tarafından sıvılaştırılır (likefaksiyon). Semen kalitesi belli numune toplama koşulları altında, testislerde spermatozoon üretimi, üremeye yardımcı organ salgıları, yakın zamanda geçirilmiş (özellikle ateşli) enfeksiyonlar, cinsel perhiz süresi gibi faktörlere bağlıdır. Bu faktörler sonuçlar yorumlanırken göz önüne alınmalıdır. Semen numunelerinin kalitesinin belirlenmesinde ejakülatın oluşum tarzının da önemli olduğuna dair çalışmalar vardır. Laboratuvar yakınındaki bir odada mastürbasyonla alınıp kaplar içine toplanan ejakülatlar, evde cinsel birleşme sırasında spermisit içermeyen kondomlara alınan ejakülate göre daha düşük kalitede olabilmektedir.

Semen kalite ölçümleri; numunenin tümünün toplanmasına, ejakülasyon sırasında konsantre epididim spermatozoasını seyrelten sıvılar salgılayan üremeye yardımcı bezlerin aktivitesine, son cinsel aktiviteden itibaren geçen zamana, sondan bir önceki cinsel perhiz süresine, ejakülat başına düşen spermatozoa sayısını etkileyen testis büyüklüğüne ve bireyin semen bileşimindeki kişiye özgü değişkenliklerine bağlı olarak değişmektedir. Bununla birlikte, tek bir semen örneğinin değerlendirilmesiyle semen kalitesini tanımlamak doğru olmamakla birlikte iki veya üç örneğin incelenmesi daha yararlı olacaktır.

Semen analizinin aşamaları aşağıda verilmiştir:

- Semen örneği, en az iki en çok yedi günlük cinsel perhizden sonra; semenin ortam sıcaklığındaki değişikliklere maruziyetini kısıtlamak, numunenin alınmasıyla analizi arasındaki zamanı kontrol etmek amacıyla laboratuvarın yakınındaki özel bir odada verilir.

İlk 5 dakika içinde:

- Numune kabı likefaksiyon için oda ısısında laboratuvar ortamında veya bir inkübatörde (37°C) bekletilir: Semen, ejakülasyonunun hemen ardından toplama kabında, tipik olarak yarı katı koagüle kitle şeklindedir. Birkaç dakika içerisinde oda sıcaklığında likefiye olmaya başlar. Likefaksiyon devam ettiği sürece semen daha homojen (su gibi) bir hale gelir. Semen örneğinin tümü oda sıcaklığında 15 dakika içerisinde, nadirde olsa 60 dakika veya daha uzun sürede likefiye olabilir. 60 dakika içerisinde tam likefiye olmazsa bu durum kayıt altına alınmalıdır.

30 - 60 dakika içinde:

- Semen görünümünün ve likefaksiyonunun değerlendirilmesi: Semen örneği likefiye olduktan sonra nazik bir şekilde, geniş kalibreli (yaklaşık 1,5 mm çapında) tek kullanımlık plastik pipet içine aspire edilerek yerçekimine karşı damlamaya bırakıldığında oluşan iplikçik gözlenerek, örneğin viskozitesi tahmin edilir. Normal semen pipetten belirgin küçük damlalar şeklinde düşer. Viskozitesi anormal olan semen damlası ise 2 cm'den uzun iplikçik oluşturur. Normal likefiye olmuş semen örneği homojen, gri-opak bir görünüme sahiptir. Spermatozoa konsantrasyonu çok düşükse, daha az opak bir görünüm alabilir; rengi de farklılaşabilir: örn: eritrositler mevcutsa kırmızı-kahverengi renkte olabilir.
- Semen hacminin ölçülmesi: Hacmin doğru saptanması, semenin her türlü değerlendirmesi için kritik olacaktır çünkü, ejakülat içindeki spermatozoanın ve spermatozoon dışı hücrelerin toplam sayısının hesaplanmasında gereklidir.
- Semen pH'sının ölçülmesi (gerekliyse): Likefaksiyondan sonra sabit bir zaman, tercihen 30 dakika geçtikten sonra pH ölçülmelidir. Ancak, pH ejakülatın verilmesinden sonra oluşan CO₂ kaybından etkilendiği için, pH ölçümü bir saat içinde mutlaka yapılmış olmalıdır.
- Mikroskopik görünümün değerlendirilmesi: Spermatozoon motilitesi ve spermatozoon sayısını değerlendirmek için gerekli seyreltme derecesini belirlemek üzere ıslak preparatın hazırlanmalıdır. Semen örneği iyice karıştırıldıktan sonra temiz bir cam lam üzerine standart hacimde, örneğin 10

ul semen damlatılır ve üzerine lamel kapatılır. Lamelin ağırlığı örneğin, lama yayılmasını sağlar. Lam ile lamel arasında hava kabarcıklarının kalmaması veya oluşmamasına dikkat edilerek içeriğin yayılması biter bitmez taze hazırlanmış ıslak preparat değerlendirilir.

- Spermatozoonların canlılığının değerlendirilmesi,
- Spermatozoa morfolojisini değerlendirilmesi
- Spermatozoa konsantrasyonunu değerlendirilmesi,
- Spermatozoa sayısını değerlendirmesi
- MAR [(mixed antiglobulin reaction (karma antiglobülin reaksiyonu)] testi uygulaması (gerekliyse),
- Peroksidaz pozitif hücreleri değerlendirmesi (yuvarlak hücreler mevcutsa),
- İmmunobead [IB] testi için spermatozoa hazırlanması (gerekliyse),
- Biyokimyasal belirteç analizi gerekliyse semenin santrifüjü

Üç saat içinde:

- Örneklerin mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilmesi (gerekliyse).

Dört saat sonra:

- Yayma preparatlarının fiksasyonu, boyanması ve spermatozoon morfolojisi açısından değerlendirilmesi.

Aynı gün ileri saatlerde (numuneler dondurulmuşsa izleyen günlerde):

- Üremeye yardımcı salgı bezleri belirteçlerinin analizi (gerekliyse),
- İndirekt immunobead (IB) testini uygulanması (gerekliyse) (Organisation, 2010).

2.3.2. Semen Analizi Normal Değerleri

Spermatozoon Konsantrasyonu

Semendeki spermatozoon konsantrasyonu, mililitre başına düşen milyon spermatozoon sayısı (milyon/ml) olarak ifade edilir. Konsantrasyon, likefiye olmuş hacmi bilinen semen örneğindeki spermatozoonların sayılmasıyla bulunur. Bu amaçla

faz-kontrast mikroskobunda x200 büyütme de hemositometre ve makler sayım lamı ölçümler için kullanılır.

Ölçülen spermatozoon konsantrasyonu;

Normospermi: Mililitrede ≥ 20 milyon spermatozoon

Oligospermi: Mililitrede ≤ 20 milyon spermatozoon

Polizoospermi: Mililitrede ≥ 250 milyon spermatozoon

Azoospermi: Ejakulatta hiç spermatozoonun bulunmaması olarak değerlendirilir.

Spermatozoon Hareketliliği

Spermatozoonların hareketliliği, ileri veya yerinde hareketli olan spermatozoayı hareketsiz olanlardan ayırt eden basit bir hareketlilik derecelendirme sistemidir. Spermatozoanın hareketliliği;

İleri hareket (Progresif Motilite; PR): Hızdan bağımsız olarak doğrusal veya geniş bir daire içinde aktif olarak hareket eden spermatozoa.

Yerinde hareket (Nonprogresif Motilite; NP): İleriye doğru hareketin olmadığı tüm diğer hareketlilik kalıpları, örn: küçük daireler halinde yüzme, başı yerinden güçlkle oynatan kamçısai hareket veya yalnızca kuyruğun kamçısai hareketi gözlenebilir.

Hareketsizlik (İmmotilite; IM): Hareketin olmaması şeklinde değerlendirilir.

Normal değerlere sahip bir semen numunesinde bulunan spermatozoon hücrelerinin hareketliliği:

Toplam hareketlilik için alt referans sınırı (PR+NP): % 40 (5. yüzdilikte, % 95 CI 38–42).

İleri hareket (PR) için alt referans sınırı : % 32 (5. yüzdelik, % 95 CI 31–34) olarak kabul edilir.

Spermatozoon Canlılığı

Spermatozoonların canlılık derecesi hücre membranlarının bütünlüğüyle belirlenen, özellikle ileriye doğru hareketli spermilerin yaklaşık % 40'dan az olduğu numuneler için önemlidir. Hareketsiz spermatozoa yüzdesi ölü hücrelerin yüzdesinden fazla olması gerektiği için, bu test motilite değerlendirmesinin doğruluğunu da kontrol edebilir. Canlı hücrelerin yüzdesi normalde hareketli spermatozoonların yüzdesinden fazladır.

Canlı spermatozoonların yüzdesi, boyayı tutmama veya hipotonik şişme testiyle sağlam membranlı hücreler belirlenerek değerlendirilir. Canlı olmayan (ölü) hücrelerde plazma membranlarının hasarlı olması, membrana penetre olmayan boyaların hücre içine girmesine izin verir ve o hücrelerin ölü olduğunu gösterir. Bu amaçla eozin-nigrosin boyama yöntemi kullanılır. Hipoozmotik şişme testi ise, yalnızca membranları sağlam (canlı hücreler) olan hücrelerin hipotonik sıvılarda şişmesi ilkesine dayanır. Şişmiş spermatozoon hücreleri, kuyruğun sarmal hale gelmesi gibi hücrenin şeklinde olan değişikliklerle fark edilir ve canlı hücreler, spermatozoon kuyruğundaki şişme bulgularıyla ayırt edilirler. Şişmiş kuyrukların tümü canlı spermatozoonlar olarak değerlendirilir.

Spermatozoon Morfolojisi

Spermatozoon morfolojisinin değerlendirilmesi; spermatozoadaki anormalliklerin yerleşiminin kaydedilmesini içeren, basit normal/anormal sınıflandırmasıdır. Spermatozoonların morfolojik olarak normal olup-olmadığını değerlendirirken, aşağıdaki kriterlere bakılır.

Semen analizinde spermatozoon; bir baş, boyun, orta parça, ana parça ve son parçadan oluşur. Son parçayı ışık mikroskopuyla görmek zor olduğundan, spermatozoon hücresinin bir baş (boyun) ve kuyruktan (orta ve ana parça) oluştuğu düşünülebilir. Spermatozoonun normal kabul edilebilmesi için, baş ve kuyruğunun normal olması gerekir. Sınırdaki şekillerin tümünün anormal olduğu düşünülmelidir.

Baş: Düzgün, genellikle oval şekilli ve düzgün sınırlı olmalıdır. Baş alanının % 40–70'ini kaplayan bir akrozom bölgesi olmalıdır. Akrozom bölgesi; büyük veya iki

küçük vakuolden fazlasını içermemeli, spermatozoon başının % 20'sinden fazlasını kaplamamalıdır. Spermatozoonun post-akrozomal bölgesi vakuol içermemelidir.

Orta parça: Yaklaşık spermatozoon başı uzunluğunda, ince, düzenli sınırlı olmalıdır. Orta parçanın ana eksenini spermatozoon başının ana eksenine bir hizada olmalıdır. Aşırı miktarlarda olması durumunda rezidüel sitoplazmada bir anomali olduğu düşünülür.

Ana parça: Uzunluğu boyunca aynı genişlikte olmalı, orta parçadan yaklaşık 45 µm uzunlukta ve ince olmalıdır.

2.3.3. Spermatozoon Anomalileri

Spermatozoon da görülen defektleri baş, boyun ve orta parça, kuyruk anormallikleri olarak sınıflandırabiliriz (Şek. 2.3.3.1.) (Auger et al., 2016).

Spermatozoon Baş Defektleri:

Çift başlı (double head): Kuyruk ve orta parça tektir ancak baş çifttir.

Büyük baş (megalo head): Baş uzunluğu 5-6 mikrondan, genişliği ise 2.5-3.5 mikrondan büyüktür.

Küçük baş: Baş uzunluğu 5-6 mikrondan, genişliği ise 2.5-3.5 mikrondan küçüktür ve genellikle akrozom anormallikleriyle ilişkilidir.

Piriform baş: Spermatozoonun baş kısmı armut şeklindedir.

Sivri baş: Spermatozoonun başı uzun ve sivridir.

Yarık baş: Birden fazla nükleusa sahip spermatozoon başıdır.

Amorf (şekilsiz) baş: Baş kısmı oval olmayan, elonge (uzamış) baş; post-akrozomda incelmeler görülür ve baş 5-6 mikrondan daha uzundur.

Diadem defekti: Spermatozoonun baş kısmında çöküntülerin yer almasına neden olan defektir. İğne baş (pin-head) spermatozoon ise baş kısmının toplu iğne şeklinde görülmesidir.

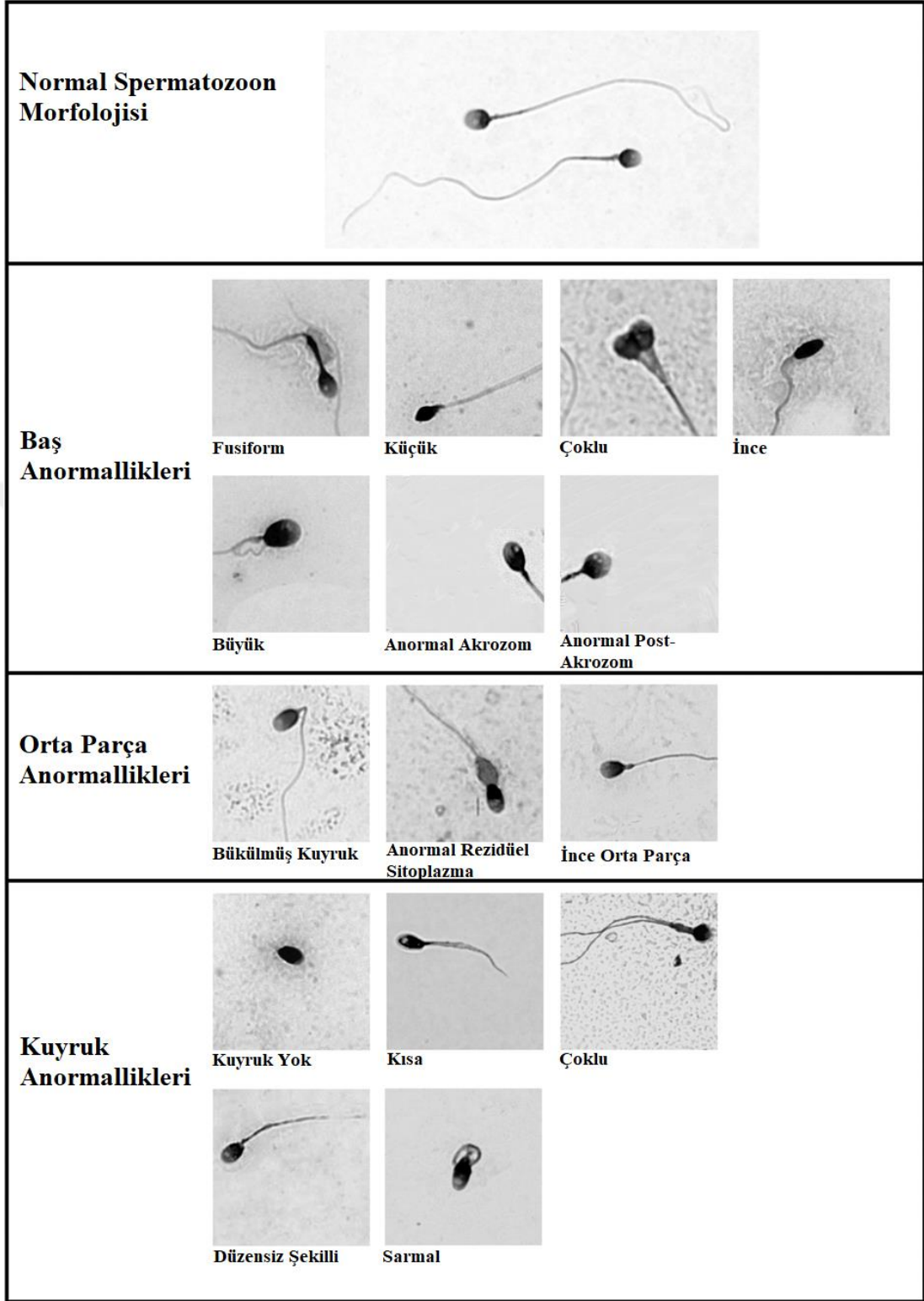
Total globozoospermi sendromu: Globozoospermi (yuvarlak başlı ve akrozomsuz spermatozoa), erkek infertilitesinden sorumlu nadir bir sendromdur (infertil erkeklerin <% 0,1'i). Ejakülatta% 100 globozoospermatozoonun varlığı total globozoospermi sendromunu tanımlar. Spermiogenez sırasında spermatozoon oluşumunda çeşitli kusurlu mekanizmaların bir kombinasyonu nedeniyle olabilir ve bazen sito-iskelet sistemi anormallikleri ile ilişkili olan akrozom oluşumunun eksikliğine de yol açabilmektedir.

Boyun ve Orta Parça Defektleri:

Bükülmüş boyun (Bent tail) (boyun ve kuyruk başın uzun eksenine göre 90°'den fazla açılanmalar gösteren), anormal rezidüel sitoplazma (orta parçaya doğru yerleşmiş spermatozoon başının üçte birinde büyük sitoplazma damlacıkları) ve ince orta-parça (spermatozoonun orta parçasında özellikle mitokondriyon kılıfının bulunmaması nedeniyle anormal incelik) şeklinde görülmektedir.

Kuyruk Defektleri:

Kuyruk olmaması (spermatozoonun sadece baş kısmının olmasıdır), kısa olması, çok sayıda kuyruğunun bulunması, düzensiz şekillerde kuyruğun olması ve sarmal kuyruğun olması gibi hatalı gelişmeleri içine alır (Gatimel et al., 2017, Organisation, 2010)



Şekil 2.3. Spermatozoon anormallikleri

2.4. Kriyoprezervasyon

2.4.1. Giriş

Kriyoprezervasyon, hücrelerin ve dokuların sıfır derecenin altındaki ısılara kadar soğutularak, bütün biyolojik aktivitelerinin durdurulup bu hücrelerin ileri zamanlarda kullanılması amacıyla saklanması ifade etmektedir (ASRM 2017). Ancak, bu işlem hem hücre içi hem de hücre dışı buz kristalleri oluşmasına neden olur. Buz kristallerinin oluşumu hücresel mekanik kısıtlamalara, zedelenmeye ve hücrelerin kimyasal ayarlarında değişikliklere yol açtığından, canlı için ölümcül bir durumdur. Hücrelerin düşük sıcaklıklarda üstesinden gelmesi gereken büyük bir engel, su-buz fazı geçişidir. Bu faz geçişi kriyoprezervasyonda farklı tekniklerin kullanılmasını doğurmuştur. Bu tekniklerden hızlı soğutma da hücre hasarı, hücre içi buz oluşumuna bağlanırken; yavaş soğutmada hasar, yüksek konsantrasyonlu hücre içi ve dışı çözeltilere veya mekanik etkileşimlere maruz kalmanın etkileriyle oluşan ozmotik değişikliklere bağlıdır (Jang et al., 2017).

Buz kristalleri oluşumunu önlemek veya aza indirmek amacıyla bazı maddeler kullanılmaktadır. C. Polge, A.U. Smith ve A.S. Parkes tarafından 1948 yılında, gliserolün spermatozoonları -70°C'ye kadar dondurulmasına imkan tanınmasını tesadüfen keşfetmeleri, kriyoprezervasyonun gelişimi adına önemli bir evre olarak kabul edilir (Pegg, 2002). Sonraki yıllarda dimetil sülfoksit (DMSO) 'in keşfiyle birlikte; birçok farklı alanda (örneğin üreme terapisi, hematopoetik kök hücre transplantasyonu, tohumların ve bitki genetik kaynaklarının bankacılığı ve rejeneratif tıp) birçok bilim adamı tarafından, başarılı kriyoprezervasyonu desteklemek için KPA kullanımı rutin hale gelmiştir (Elliott et al., 2017).

2.4.2. Kriyoprotektan Ajanlar

Birçok bileşik, kriyoprotektan olarak etki eder ve hücrelerin donmaya karşı korunmasında kullanılır. İki tip kriyoprotektan:

a) Hücre membranından serbestçe geçebilen; gliserol (G), etilen glikol (EG) ve dimetil sülfoksit (DMSO)

b) Hücre membranından geçemeyen; süktroz, trehaloz gibi şekerler şeklinde sınıflandırılır (Pedro et al., 2005).

Hücre membranından serbestçe geçebilen KPA'lar, ozmotik olarak aktif değildir çünkü bunlar, hücre içi ve hücre dışı alanlarda eşit olarak dağılmıştır. Bununla birlikte, eklenen KPA, hücrelere ozmotik stres oluşturur çünkü, su nüfuz eden kriyoprotektan ajana kıyasla, hücre membranı üzerinde daha hızlı hareket eder. Bu, hücrenin iç ve dış kısımlarında eşit bir kriyoprotektif madde dağılımına ulaşılana kadar, başlangıç bir ozmotik dengesizlikle ve hücrelerin büzülmesi ardından su ve kriyoprotektif ajanların yer değiştirmesiyle sonuçlanır.

Hücre membranından geçemeyen KPA'lar, osmotik olarak aktif olan disakkaritler (süktroz, trehaloz) ve osmatik olarak inaktif olan polisakkaritler (maltodekstrin), proteinler (albümin, polivinilpirolidon) olarak ayrılırlar. Süktroz gibi bileşiklerin, hücre membranlarını geçmediğine inanılır ve bunlar, dondurularak koruma ortamının ozmolalitesini arttırdıklarından, hücresel dehidratasyona neden olurlar. Büyük makromoleküllerin eklenmesi, ortam ozmolalitesine çok az katkıda bulunur ve bu, hücresel dehidrasyona neden olmaz (Sieme et al., 2016).

2.4.3. Kriyoprezervasyon Yöntemleri

Kriyoprezervasyon için kullanılan teknikler geleneksel olarak biyolojik örneklerin soğuma hızlarına bağlı olarak gruplara ayrılmıştır: kontrollü yavaş (0.1-5 derece/dk), hızlı (10-100 derece/dk) ve ultra-hızların geliştiği vitrifikasyon (> 10.000 derece/dk).

Kontrollü yavaş dondurma, adım adım programlanmış sıcaklıklarda sıcaklık düşüşleriyle gerçekleştirilir. İşlem, uzun ve pahalı ekipman kullanımını gerektirir. Hücre donarken içinde oluşabilen buz kristali hücre için ciddi zararlı etki yaratabilir.

Hızlı dondurma, yavaş dondurma ve vitrifikasyon arasında bir ara yol tekniği olarak düşünülebilir. Yavaş dondurma tekniğinden daha hızlıdır, programlanabilir makinelerin kullanımını içermez bu nedenle ekonomiktir ve vitrifikasyon da kullanılanlardan daha düşük kriyoprotektan maddeler gerektirir.

Vitrifikasyon, yüksek miktarlarda kriyoprotektan ajanların (ağırlık/hacim %40'ı aşan) kullanıldığı bir yöntemdir. Bu yöntemde aşırı derecede soğutulmuş visköz sıvı buz kristal oluşumuna fırsat vermeden cam formuna geçerek hızla dondurmaya neden olur. Pahalı ekipman içermediği için vitrifikasyon daha az maliyetlidir. Bu teknik, kontrollü yavaş dondurmadaki gerekli 1-2 saatle kıyaslandığında sadece birkaç dakika gerektirir, bu nedenle zaman yönünden verimli bir yöntemdir (Gurruchaga et al., 2018, AbdelHafez et al., 2010).

Kriyoprezervasyonda istenilen yüksek soğutmaya ulaşabilmek için kriyoprotektif ortamın özel taşıyıcılara ihtiyacı vardır. Bu şartları sağlamak için, sıvı nitrojen içine daldırılan örneklerin yüksek hızları sağlayabilen taşıyıcılar içerisinde saklanması gerekir.

2.4.4. Kriyoprezervasyon Saklama Yöntemleri

Açık ve kapalı olmak üzere iki gruba ayrılabilen çeşitli sistemler kullanılmaktadır. Kontrollü yavaş dondurma da, kural olarak, kapalı ortamlar pipet (straw) ve kriyotüp tercih edilir. Kriyoloop ve kriyotop gibi açık ortamlar çoğunlukla vitrifikasyon için kullanılır. Bunların yanında standart pipetler hem açık hem de kapalı olarak kullanılabilen sistemlerdir. Kapalı sistemlerin, sıvı nitrojene maruz kalma sırasında örneğin kontaminasyonunu önleyeceğine inanılmaktadır.

Çözme basamağı, kriyoprezervasyonu yapılan örneklerin hayatta kalması için önemli bir aşamadır. Kriyoprezervasyon saklama kutusuna, donma yöntemine ve kullanılan kriyoprotektana bağlıdır. Kriyoprotektanların uzaklaştırılması işlemi, kriyoprotektanların kademeli olarak azaltılmış konsantrasyonlarındaki çözeltilerden hücrelerin osmotik basıncı aza indirecek şekilde geçirilmesiyle yapılır (Yurchuk et al., 2018).

2.4.5. Spermatozoon Kriyoprezervasyonu

Semen kriyoprezervasyonu, Lazaro Spallanzani'nin (1776) spermatozoayı kar içerisinde soğutarak korumayı başararak ilk kez gerçekleşmiştir. Polge'nin gliserolün kriyoprotektant özelliklerini keşfetmesiyle de doğurganlığın korunması

alanında bir dönüm noktası oluşturmıştır. Bu gelişmeden sonra, farklı türlerde semenlerin kriyoprezervasyonu için tekniklerde önemli gelişmeler olmuştur. Dondurulmuş spermatozoadan elde edilen döller 1951 (inek), 1953 (insan), 1957 (domuz, at) ve 1967 (koyun) olarak bildirilmiştir. Spermatozoa kriyobankaları 1960'larda sığırlar için ve 1970'lerde insanlar için geliştirilmiştir. Günümüzde, hayvanların suni tohumlanması ve insan için yardımcı üreme teknolojisi, kriyoprezervasyonlu spermatozoayı rutin olarak kullanmaktadır. Bununla birlikte, spermatozoa kriyobiolojisinde sayısız başarıya rağmen, kriyoprezervasyondan sonra canlı spermatozoayı en iyi şekilde koruyabilen yöntemler için araştırmalar devam etmektedir (Hezavehei et al., 2018).

İnsan spermatozoa kriyoprezervasyonunu gerektiren birçok klinik durum söz konusudur. İzole erkek faktör infertilitesi; tüm infertil çiftlerin % 20'sini etkilemekteyken, kombine nedenli infertiliteğin % 20-40'ını etkilemektedir. İntraoperatif olarak saptanan spermatozoanın kriyoprezervasyonu, azospermi veya şiddetli oligozoospermili erkeklerde donör spermatozoon veya ek cerrahi ihtiyacını ortadan kaldırmaktadır. Adölesan ve yetişkinlerde görülen kanser tedavilerindeki gelişmeler, üreme yaşlarındaki hastaların sağ kalım oranlarını arttırmış, tedavi öncesinde gametlerin dondurulması üremenin devamı için iyi bir seçenek oluşturmıştır (Justice and Christensen, 2013).

2.4.6. Spermatozoon Kriyoprezervasyonda Hasar Oluşumu

Kriyoprezervasyon süreci, hücreleri, düşük sıcaklık ve ozmotik dengesizliklerin neden olduğu strese maruz bırakır. Biyomoleküllerin azalan sıcaklıklara maruz bırakılması, konformasyonel (geri dönüşümsüz) değişikliklere yol açabilir. Kriyoprezervasyon sırasında ozmotik stres, ağırlıklı olarak hücre dışı buz oluşumu nedeniyle gerçekleşir. Hücre dışı donmamış fraksiyondaki katı konsantrasyonun artması, hücrelerin dehidrate olmasına neden olur. Donma sırasında hücresel dehidratasyon, hücre içi ve hücre dışı çözünme konsantrasyonu arasında dengeyi korumak amacıyla hücre dışına su taşınmasının sonucudur. Dehidratasyon özellikle düşük soğutma oranları kullanıldığında ortaya çıkar. Hücreler, ozmotik tolerans sınırlarının ötesinde küçüldüklerinde veya şiştiklerinde bu ölümcül olabilir. Özellikle

hızlı soğutma hızlarında, hücreler, su kaybetmek için yeterli zamana sahip olamadıklarından hücre içi su içeriği, hücre içi buz oluşumuna yol açacak kadar yüksek kalır. Ayrıca, kriyoprotektif ajanların eklenmesi ve çıkarılması da, hücreleri ozmotik strese maruz bırakmaktadır. Çoğu kriyoprotektan ajanlar spermatozoonlara bir dereceye kadar toksisite gösterirler. Bu toksisite çeşitli önlemler alınarak en aza indirilebilir.

Kriyoprotektif ajanların eklendiği sıcaklık da kritiktir. Kriyoprotektanların oda sıcaklığında eklenmesi gerektiği bildiren çalışmaların yanında, düşük sıcaklıklarda önceden soğutulmuş kriyoprotektanların eklenmesinin daha koruyucu olduğunu öne süren çalışmalarda bulunmaktadır. Ozmotik stresin azaltılması için semene kriyoprotektanların kademeli olarak eklenmesi faydalıdır. Çözdürmeden sonraki ölçümler, yavaşça izotonik koşullara geri dönmek için numunenin kademeli olarak seyreltilmesini içerir. Bazı özel durumlarda donma bileşimi, maksimum kriyo-uyum sağlaması için özel olarak tasarlanması gerekebilir (Sieme et al., 2016, Sieme et al., 2015).

Spermatozoon dondurulması, spermatoza motilitesi ve canlılık kaybı, ultra-yapısal değişiklikler, akrozomal hasar, mitokondriyal membran depolarizasyonu, plazma membranındaki değişiklikler, çekirdek ve DNA hasarı gibi spermatozoon üzerinde olumsuz etkilere sahiptir. Bunlara ek olarak kriyoprezervasyonu yapılan spermatozoonların proteomunda değişiklikler olduğu bildirilmiştir. Spermatozoon dondurulmasının, ephrin R-aktin yolağı, reaktif oksijen türleri (ROS) metabolizması yolu, aktin-hücre iskeleti düzeneği, aktin-hücre iskeleti regülasyonu ve guanilat siklaz yolu dahil olmak üzere birçok sinyal yolunda yer alan proteinlerin ekspresyonunu da değiştirdiği gösterilmiştir. Önceki çalışmalar, insan spermatozoasının donma-çözülmesinin, ROS ve apoptosinin oluşumunu aşırı indüklediğini ve antioksidan aktiviteyi azalttığını göstermiştir.

Kriyoprezervasyona bağlı ROS oluşumu sonuçta spermatozoon kalitesi ve doğurganlık kapasitesini tehlikeye atabilecek olan çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) peroksidasyonuna, DNA ve hücrel hasara, hücrel apoptosize yol açabilir. Son zamanlarda yapılan birçok çalışma, oksidatif stres (OS) indüksiyonu ve kriyoprezervasyon arasındaki yakın ilişki nedeniyle erkek fertilitésinin korunmasında

antioksidanların rolüne odaklanmıştır. Bu çalışmaların çoğu, kriyoprezervasyon ortamına ekzojen antioksidanların eklenmesinin, sperm kriyoprezervasyonunun olumsuz etkilerini tersine çevirdiğini bildirmiştir (Najafi et al., 2018).

2.5. Spermatozoon Kriyoprezervasyonunda Antioksidan Maddeler

2.5.1. Koenzim Q10

Koenzim Q10 (CoQ10), vücudumuzdaki her hücrede doğal olarak bulunan yağda çözünen, vitamin benzeri bir moleküldür. Diyetimizin normal bir parçasıdır ama aynı zamanda endojen olarakta sentezlenir. Elektronların, mitokondriyal oksidatif solunum zincirinin yanı sıra adenosin trifosfat (ATP) üretimi için uygun şekilde aktarılmasında görevlidir. Bununla birlikte CoQ10, lipid peroksidasyonundan membran proteinlerini ve fosfolipitleri korumak için serbest radikal süpürücü olarak hareket eder ve bu da tokoferolün rejenerasyonu ile gerçekleşir.

Ekzojen CoQ10, herhangi bir tıbbi durumu tedavi etmek için FDA onaylı değildir, ancak bir diyet eki olarak önerilmektedir. Nörodejeneratif hastalıklar, fibromiyalji, diyabet, kanser, mitokondriyal hastalıklar, kas hastalıkları ve kalp yetmezliği gibi hastalıklar, dolaşımdaki CoQ10 düzeylerinin azalmasıyla ilişkilendirilmiştir (Sood and Whitten, 2018, Shukla and Dubey, 2018).

Lipofilik bir bileşik olmasına rağmen, CoQ10 preparatları genellikle düşük biyoyararlanım gösterir. CoQ10'un daha düşük biyoyararlanımı, hidrofobikliği, büyük moleküler ağırlığı (863 Da) ilişkilendirilebilir. CoQ10'un iki formu vardır: ubikinol ve ubikino; daha yüksek biyoyararlanımı olan ubikinoldür. Farklı CoQ10 biyoyararlanılığı, çeşitli farmasötik formlar (toz, süspansiyon, yağ çözeltisi veya çözündürülmüş form) kullanılarak sağlanır. Daha iyi absorpsiyon ve daha yüksek plazma konsantrasyonu nedeniyle çözünmüş CoQ10 tercih edilir.

Farmakolojik veya terapötik etkilerin gözlemlenmesi için yapılan insan çalışmalarında uzun zaman periyotlarında (aylar) çok yüksek günlük CoQ10 dozlarının (300-3000 mg / gün) kullanılmasının gerekli olduğu bildirilmiştir. ROS'tan

korunma için gerekli miktarlar çok yüksektir. Hayvan modellerinde, intravenöz yoldan uygulanan 14C-işaretli CoQ10'un, en az 22 gün boyunca mitokondri iç zarlarında artmış radyoaktivite ile tespit edildiği gösterilmiştir. Oral uygulama da benzer sonuçlar vermiştir (Jankowski et al., 2016).

2.5.2. Koenzim Q10 ve Erkek İnfertilitesi

Spermatozoa; katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve vitamin E gibi düşük miktarlarda hücresel ROS savunma sistemine sahiptir. Bunun yanında seminal plazma da antioksidan sıvı olma kapasitesindedir. Bu koruyucu sistem, oksijen radikallerine karşı koyabilen ve böylece serbest radikal zincir reaksiyonlarının yayılmasını önleyen zincir kırıcı antioksidanları içerir. Ciddi oligospermi ve astenozoospermi vakalarında oksidatif stresin seminal özellikleri değiştirdiği gösterilmiştir. Bazı açıklanamayan normozoospermik infertil vakalarda da oksidatif stres infertilitenin nedeni olabilir. Bunun yanında bazı çalışmalarda varikosel (VAR) olan erkeklerde spermatozoal reaktif oksijen türlerinin normal kontrollere göre daha yüksek olduğunu göstermiştir, bu da VAR hastalarında spermatozoon disfonksiyonunun kısmen oksidatif stresle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Sigara içimi öyküsü olan infertil bireyler, sigara içmeyen infertil bireylere göre daha yüksek ROS düzeyleri sergilerler. Ayrıca, diğer patofizyoloji mekanizmaları, sitokinlerle etkileşime girmeleri, hücrelerin redoks durumuna bağlı olarak nitrik oksit etkilerinin modifikasyonu ve Fas bağımlı apoptosiz gibi mekanizmalarla dolaylı olarak ilişkili olabilir.

İnsanda Koenzim Q10'un 1957'deki keşfinin ardından çalışmalar özellikle mitokondriyal biyoenerjideki anahtar rolü üzerinde yoğunlaşmıştır. Sonraki çalışmalarda hücre içi başka alanlar ve plazmadaki varlığı gösterilmiş ve özellikle antioksidan rolü üzerinde yoğunlaşmıştır. Son çalışmalarda koenzim Q10'un hücre sinyal yolağındaki gen ekspresyonlarını etkilediği metabolizması ve transportunda etkin olduğu ifade edilmiştir. Koenzim Q10'un dışardan alınmasında bu etkilere katkı sağlayabileceği iddaa edilmektedir. Hem biyoenerjitik hemde antioksidan etkisi erkek infertilitesinde etkili olabilir çünkü spermatozoa çok sayıda mitokondriona sahiptir ve kuyruğunun hareketi için yüksek enerjiye ihtiyacı vardır.

Rastgele seçilmiş erkek infertilitesi hastalarında CoQ10 uygulamasıyla ilgili özgün bir çalışmada, membran bütünlüğü testinde, seminal parametrelerde ve spermatozoon patolojisinde iyileşme olduğu gösterilmiştir. Ancak bu çalışmada hastalardaki endojen CoQ10 seviyeleri bildirilmemiştir.

Lewin & Lavon koenzim Q10 tedavisi yaptığı normal hareketliliğe sahip spermatozoon örneklerinde hareketlilikte önemli değişiklik görülmesede, astenozoospermik vakalarda anlamlı olarak motilitenin arttığı gösterilmiştir. Aynı çalışma da 17 ICSI'de düşük fertilizasyon oranı olan vakada CoQ10'un 60 mg/gün 103 gün süreyle verildiğinde birçok spermatozoon parametresinde belirgin bir değişiklik olmasada bu vakaların fertilizasyon oranları anlamlı olarak yükselmiştir.

Koenzim Q10, spermatozoonun total antioksidan kapasitesine katkıda bulunan bileşiklerden biri olması nedeniyle ve azalması oksidatif stresi önlemede sistemin bozulmasına yol açabilmektedir. CoQ10'un eksojen uygulaması spermatozoonun içeriğini artırabilir ve hücrenin fonksiyonunu geliştirebilir (Balercia et al., 2009). Bunun yanında spermatozoonların orta parçasında bulunan yoğun mitokondrionlarla hareket için enerji oluşturulmasında da koenzim Q10'un major bir enerji sağlayıcı ajan olması üzerinde durulmaktadır. Çalışmamızda antioksidan ve enerji sağlayıcı etkinin dondurulmuş hücrelerde de aynı etkiyi sağlayabilirliği araştırmak istenmiştir.

2.5.3. Kurkumin

Kurkumin, köri tozunun ana bileşenlerinden biri olan Curcuma longa'dan (zerdeçal) elde edilen fenolik bir bileşiktir. Kurkumin, parlak turuncu-sarı renkte kristalimsi bir bileşik olarak görünür. Gıda katkı maddesi ve renklendirici olarak da kullanılır. Dünya Sağlık Örgütü, kabul edilebilir günlük kurkumin alımını 0-3 mg / kg aralığında bir gıda katkı maddesi olarak belirtmiştir. Zerdeçal; tıbbi kullanımıyla, 4000 yıl öncesine dayanan Hindistan'daki Vedic kültüründe, bir baharat olarak kullanıldığı ve dini öneme sahip olduğu bilinen bir bitkidir (Salehi et al., 2018, Lestari and Indrayanto, 2014).

Hidrofobik bir moleküldür; bununla birlikte, zayıf biyoyararlanım ve dağılım gösterip, suda çözünmez. Kurkumin; DMSO, metanol, aseton ve etanol gibi polar

çözücülerde çözünür. Bu nedenle, hidrofobik bölgelerde, örneğin, hücrelerin zarında birikme eğilimi gösterir. Kurkumin hidrofobik indirgeyici (antioksidan) bir ajan olarak çalışabilir ve böylece çeşitli reaktif oksijen türlerini (ROS) temizleyebilir. Kurkumin'in oksidatif stresi baskılayan vitamin E'den daha iyi olduğu da gösterilmiştir.

Kurkumin esas olarak serbest radikalleri temizleyerek oksidatif stresi azaltır. Çalışmalar, kurkuminin serbest radikalleri doğrudan kaldırabildiğini ve ROS üretimini önleyebildiğini göstermiştir. İnfluenza A virüsü kaynaklı oksidan stresi olan A549 hücrelerinde, kurkumin tedavisinin, influenza A virüsü enfeksiyonunun baskılanmasından sorumlu olabilecek Toll-like reseptörün aktivasyonu sağladığı ve ROS üretimini engellediği bulunmuştur. Diyabetik farelerde ise kurkumin tedavisi, DNA metiltransferaz işlevlerini geri kazandırarak hiperglisemiye bağlı oksidatif stresi ve ROS üretimini inhibe eder.

Kurkumin, antioksidan enzimlerin aktivitelerini de artırabilir. Kurkumin uygulaması sonucu aflatoksin B1'in etkilerini; katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon-S-transferaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitesi, glutatyon seviyesindeki artış ve gen ekspresyonları üzerinden etki ederek iyileşme sağlamıştır. Ayrıca, zimosan tarafından indüklenen SOD'un azalmış aktivitesini önemli ölçüde tersine çevirir ve malondialdehit düzeyindeki artışı azaltır. Bunların yanında kurkumin, kan plazması ve eritrositlerde glutatyon seviyesini arttırırken, aynı zamanda plazmanın oksidan potansiyelini azaltır. İn vitro bir çalışmada da kurkuminin antioksidan aktivitesinden dolayı nükleer faktör κ B aktivasyonunu bloke ettiği gösterilmiştir (Xu et al., 2018).

Kurkumin; antioksidan, antidepresan , antibakteriyel, antiviral, antifungal, antitümör, immüno-modülatör, antispazmodik ve hepatoprotektif gibi geniş bir terapötik etki spektrumunun yanı sıra Alzheimer hastalığı, tardif diskinezi, majör depresyon ve diğer nörolojik bozukluklar için de etki potansiyeline sahip olduğu yayınlarda bildirilmiştir. Güçlü anti-enflamatuar aktiviteye sahip olduğu ve enflamatuar sitokinlerin üretimini inhibe ettiği kanıtlanmıştır (Sun et al., 2018).

2.5.4. Kurkumin ve Erkek İnfertilitesi

Kurkuminin antioksidatif ve antiinflamatuvar özelliklerine bağlı olarak, erkek infertilitesinde spermatozoon kalitesini düzeltmesi ile ilgili araştırmalar giderek artmaktadır. Kurkumin, in vitro spermatozoon fonksiyonunu (motilite / kapasitans ve akrozom reaksiyonu / fertilizasyonu) ve in vivo fertilitayı etkilediği bildirilmiştir. Kurkuminin intravaginal uygulanması, fertilitate anlamlı azalmaya neden olmuştur. Kurkuminin spermatozoa motilitesini inhibe ettiğine dair moleküler mekanizmalar tanımlanmamıştır (Zhang et al., 2017, Naz, 2014).

Lökositospermik hastalarda, semen içindeki aşırı H_2O_2 'in, spermatozoon mitokondriyal yapısına ve fonksiyonuna zarar vererek hücrenin hareketliliğinde düşüşe yol açar. Lökositospermik hastalarda yapılan in vitro çalışmada kurkumin, antioksidan etki ederek H_2O_2 'nin neden olduğu mtDNA ve mitokondriyal solunum zincirindeki yaralanmayı önlemiş ve böylece spermatozoa kalitesini ve hareketliliğini korumuştur (Zhang et al., 2017).

Sıçanlarda yapılan oral kurkumin tedavisinin; spermatozoon sayısını arttırdığı buna karşılık spermatozoon hareketliliği, anormal spermatozoon konsantrasyonu ve spermatozoon canlılığın değiştirmediği bulunmuştur. Ayrıca sıçanlarda testosteron seviyelerinde artış olduğu görülmüş ve kurkuminin erkek fertiletisini ve cinsel işlevlerini artırabileceği gösterilmiştir (Abarikwu et al., 2014).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Doğum Hastalıkları Tüp Bebek Merkezi Kliniğine başvuran, sağlıklı gönüllü erkeklerden alınan semen örnekleri çalışmaya dahil edildi. Çalışma protokolü Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İlaç Dışı Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylandı ve Helsinki Deklarasyonu'na göre yürütüldü.

Semen örnekleri üç günlük cinsel perhiz sonrasında mastürbasyon yöntemiyle steril kaplara alındı. Ön deneylerde 10 kişiden, deneyler için ise 40 kişiden alınan semen örnekleri kullanıldı. Gönüllülerden alınan semen örnekleri kurkumin ve koenzim CoQ10 antioksidan maddeleri ile donduruldu. Örnekler standart çözme protokolü ile çözüldü. Ön deneylerde spermatozoonların hareketlilikleri, CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis - Bilgisayar Destekli Semen Analiz Sistemi) cihazında; canlılıkları ise histolojik eozin-nigrasin boyama yöntemiyle değerlendirildi. Belirlenen uygun antioksidan dozların ardından deneylere devam edildi. Deney gruplarının dondurma çözme işlemi uygulanması sonucunda spermatozoonların; hareketlilik - CASA cihazı, canlılık - propidium iodide boyama yöntemiyle immunfloresan ve akım sitometrisi, akrozom bütünlüğü - Peanut agglutinin (PNA) boyası ile immunfloresan ve akım sitometri, DNA hasarı - Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Transferase Mediated Nick End-Labeling (Tunel) boyası ile immunfloresan ve akım sitometrisi, hücrelerdeki total antioksidan ve oksidan seviyeleri - biyokimyasal Rel Assay Kit ile değerlendirildi.

3.1. Gereç

3.1.1. Spermatozoon Kriyoprezervasyonu

1. PureSperm 40/80 Dansite Gradyent Medyum (Nidocan)
2. SpermRinse (Vitrolife, 10101)
3. Sperm Freezing Medium (Sperm Dondurma Medyum) (Vitrolife)
4. Kurkumin (Sigma Aldrich C1386)
5. Koenzim Q10 (Sigma Aldrich C9538)

6. Kriyovial (Nunc)
7. Kayne
8. Sıcak su banyosu
9. PBS (Sigma, P4417)

3.1.2. CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis - Bilgisayar Destekli Semen Analiz Sistemi)

1. CASA (Hamilton Therno/HT Casa II)
2. Makler kamarası (Sefi-Medical Instruments)

3.1.3. Histolojik Eozin-Nigrosin Boyama

1. Eozin Y boyası (Sigma Aldrich E6003)
2. Nigrozin boyası (Sigma Aldrich N4754)
3. NaCl
4. Saf su
5. Kapatma Medyumu, Entellan (Merck, 107961)
6. Lam (Citoglass)
7. Lamel (Citoglass)
8. Işık Mikroskop (Carl Zeiss, Axioskop 451485)

3.1.4. Propidium Iodide (PI) Boyama - Immunfloresan Mikroskobu

1. PBS (Sigma, P4417)
2. Propidium Iodide (LeukoSure Stain Reagent, 562747)
4. İnkübatör (Shellab, 2123)
5. Eppendorf Tüpü
6. Kapatma medyumu, Entellan (Merck, 107961)
7. Poli-L-Lizin (Sigma, P8920)
8. Lam (Citoglass)
9. Lamel (Citoglass)
10. Floresan mikroskop (Carl Zeiss, Axioskop 451485)

3.1.5. Propidium Iodide (PI) Boyama - Akım Sitometrisi

1. PBS (Sigma, P4417)
2. Propidium Iodide (LeukoSure Stain Reagent, 562747)
4. İnkübatör (Shellab, 2123)
5. Eppendorf Tüpü
6. Akım sitometri (CytoFLEX, A00-1-1102)

3.1.6. Peanut Agglutinin (PNA) Boyama - Immunfloresan Mikroskopu

1. PAP-Pen (Sigma, Z377821)
2. PBS (Sigma, P4417)
3. Peanut agglutinin (PNA) (FL-1071)
4. İnkübatör (Shellab, 2123)
5. Kapatma medyum
6. Poli-L-Lizin (Sigma, P8920)
7. Lam (Citoglass)
8. Lamel (Citoglass)
9. Floresan mikroskop (Carl Zeiss, Axioskop 451485)

3.1.7. Peanut Agglutinin (PNA) Boyama – Akım Sitometrisi

1. PBS (Sigma, P4417)
2. Peanut agglutinin (PNA) (FL-1071)
4. İnkübatör (Shellab, 2123)
5. Eppendorf Tüpü
6. Akım sitometri (CytoFLEX, A00-1-1102)

3.1.8. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Transferase Mediated Nick End-Labeling (Tunel) Boyama - Immunfloresan Mikroskobu

1. PAP-Pen (Sigma, Z377821)
2. PBS (Sigma, P4417)
3. Fiksasyon çözeltisi:
 - %0.4 PFA
 - PBS (Sigma, P4417)
4. Geçirgenlik çözeltisi:
 - %0.1 Triton X-100 (Sigma, X100)
 - Sodyum sitrat tri-basik dihidrat (Sigma-Aldrich 71405)
 - PBS (Sigma, P4417)
7. In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Sigma-Aldrich 11684795910 Roche)
8. Kapatma medyumunu
9. Poli-L-Lizin (Sigma, P8920)
10. Lam (Citoglass)
11. Lamel (Citoglass)
12. Floresan mikroskop (Carl Zeiss, Axioskop 451485)

3.1.9. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Transferase Mediated Nick End-Labeling (Tunel) Boyama - Akım Sitometrisi

1. PBS (Sigma, P4417)
2. Eppendorf Tüpü
3. Fiksasyon çözeltisi:
 - %0.4 PFA
 - PBS (Sigma, P4417)
4. Geçirgenlik çözeltisi:
 - %0.1 Triton X-100 (Sigma, X100)
 - Sodyum sitrat tri-basik dihidrat (Sigma-Aldrich 71405)
 - PBS (Sigma, P4417)

5. In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Sigma-Aldrich 11684795910 Roche)
6. İnkübatör (Shellab, 2123)
7. Akım sitometri (CytoFLEX, A00-1-1102)

3.1.10. Biyokimyasal TAS (Total Antioksidan Seviyesi) ve TOS (Total Oksidan Seviyesi) Ölçümü

1. Total Antioxidant Status (TAS) Kiti (Relassay, Turkey)
2. Total Oxidant Status (TOS) Kiti (Relassay, Turkey)
3. Biyokimya Otoanalizörü (Mindray BS300)
4. Homojenizatör (Heidol D1ax 900)
5. Eppendorf Tüpü

3.2. Yöntem

Alınan örnekler 37°C sıcaklıkta likefaksiyon için 30 dakika inkübe edildi. Bu süre içinde likefiye olmayan semen örnekleri çalışma dışı bırakıldı. Likefaksiyon semenin pipet ucuyla uzayıp uzamadığının kontrolüyle değerlendirildi.

3.2.1. Ön Deneyler

Likefiye olmuş semen örneğinde, koenzim Q10 ve kurkumin antioksidanlarının hangi dozlarda semen kriyoprezervasyonunda kullanılabilirliğini ve hücreler üzerinde olası toksik etkilerini tespit etmek amacıyla ön deneyler gerçekleştirildi. Literatürler de göz önüne alınarak kullandığımız maddelerin yağda çözünürlüğü bilindiğinden gliserolde çözülebilecekleri düşünüldü. Bu amaçla öncelikle saf gliserolde çözüldükleri gösterildikten sonra rutinde kullanılan ve gliserol içeren spermatozoon kriyoprotektan medyumunu çözücü olarak tercih edildi. Kullanım kolaylığı açısından rutin olarak kullanılan bu kriyoprotektanın koenzim Q10 ve kurkumin ile koruyuculuğunun arttırılabileceği düşünülerek çalışma planlandı.

Likefiye olmuş semen örneğinde öncelikle 5 µl alınarak makler kamerasın da spermatozoonların sayısı, hareketliliği ve morfolojik görünümü değerlendirildi.

Normal semen parametrelerine sahip örnekler 40/80 gradiyent medyumunda 300 g'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Altta kalan pelete 5 ml'lik spermatozoon yıkama medyumunu eklendi, 300 g'de 10 dakika santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırıldı. Altta kalan spermatozoon hücrelerinin bulunduğu pelet örneği 9 gruba ayrıldı ve antioksidan içeren spermatozoon dondurma medyumunu ile 1:1 oranında karıştırılarak kriyoviallere (dondurma tüpleri) alındı. Gruplar;

Grup 1: 0,5 ml Spermatozoon Süspansiyonu + 0,5 ml Spermatozoon dondurma medyumunu (SDM) (kontrol),

Grup 2: 0,5 ml Spermatozoon Süspansiyonu + 0,5 ml SDM içerisinde çözdürülmüş kurkumin (toplam kurkumin konsantrasyonu 0,25 mM)

Grup 3: 0,5 ml Spermatozoon Süspansiyonu + 0,5 ml SDM içerisinde çözdürülmüş kurkumin (toplam kurkumin konsantrasyonu 0,5 mM)

Grup 4: 0,5 ml Spermatozoon Süspansiyonu + 0,5 ml SDM içerisinde çözdürülmüş kurkumin (toplam kurkumin konsantrasyonu 1 mM),

Grup 5: 0,5 ml Spermatozoon Süspansiyonu + 0,5 ml SDM içerisinde çözdürülmüş kurkumin (toplam kurkumin konsantrasyonu 1,5 mM)

Grup 6: 0,5 ml Spermatozoon Süspansiyonu + 0,5 ml SDM içerisinde çözdürülmüş koenzim Q10 (toplam koenzim Q10 konsantrasyonu 25 µM)

Grup 7: 0,5 ml Spermatozoon Süspansiyonu + 0,5 ml SDM içerisinde çözdürülmüş koenzim Q10 (toplam koenzim Q10 konsantrasyonu 50 µM)

Grup 8: 0,5 ml Spermatozoon Süspansiyonu + 0,5 ml SDM içerisinde çözdürülmüş koenzim Q10 (toplam koenzim Q10 konsantrasyonu 100 µM)

Grup 9: 0,5 ml Spermatozoon Süspansiyonu + 0,5 ml SDM içerisinde çözdürülmüş koenzim Q10 (koenzim Q10 konsantrasyonu 150 µM) olarak düzenlendi.

Vialler kapatıldıktan sonra hafif şekilde alt-üst edilerek dondurma medyumuyla karışması sağlandı ve sıvı azot buharına alındı. 30 dakika sıvı azot buharında tutulduktan sonra örnekler sıvı azota alındı.

Bir hafta sonra örnekler sıvı azottan çıkarıldı ve 1 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 10 dakika kadar 37°C'lik sıcak su banyosunda tutuldu. Sonrasında tüplerin kapakları açılarak yıkama için santrifüj tüplerine aktarıldı ve üzerine fosfatlı tampon solüsyonu (PBS) eklenip 300 g'de 10 dakika santrifüje edildi, üstte kalan kısım atıldı.

Çözünen spermatozoonların motilite özellikleri CASA (Computer-assisted sperm analysis - bilgisayar destekli semen analiz sistemi) sisteminde, canlılıkları ise histolojik eozin-nigrozin boyama yöntemiyle değerlendirildi.

3.2.1.1. CASA (Computer-assisted sperm analysis - bilgisayar destekli semen analiz sistemi)

Spermatozoon süspansiyonunun ardışık görüntülerini bir dedektör dizisine yansıtan, bir çerçevedeki veya ışık saçılımındaki piksellerin yoğunluğuna dayalı olarak nesneleri tespit eden ve istenen bilgiyi elde etmek ve çıktıyı üretmek üzere özel bir yazılım kullanan bilgisayarlı analiz sistemleridir. Sistemler, incelenen ve tarif edilen her bir spermatozoonun morfolojisi veya hareketi için birçok veriyi sağlar (Amann and Waberski, 2014).

Bazı CASA motilite parametreleri:

VCL: Eğrisel Hız ($\mu\text{m/s}$). Spermatozoon başının iki boyutta algılandığı gerçek eğrisel yoldaki ortalama hızı. Hücre canlılığının bir göstergesidir.

VSL: Doğrusal Hız ($\mu\text{m/s}$). Spermatozoon başının ilk tespit edilen konumu ile en son konumu arasındaki düz çizgi sürecindeki ortalama hızı.

VAP: Ortalama yol hızı ($\mu\text{m/s}$). Spermatozoon başının ortalama yörüngedeki hızı. Bu yörünge eğrisel yolun CASA cihazlarındaki algoritmalara göre düzleştirilmesi ile hesaplanır.

ALH (μm): Spermatozoon başının ortalama yolu boyunca laterale doğru saptığı uzaklık.

LIN: Doğrusallık. Eğrisel yörüngelerin doğrusallığı, VSL/ VCL.

WOB: Dalgalanma. Gerçek yörüngede ilerlerken izlenen dalgalanmanın ölçüsü, VAP/VCL.

STR: Doğrusallık. Ortalama yörüngenin doğrusallığı, VSL/ VAP.

BCF: Çapraz geçiş frekansı (Hz). Eğrisel yörüngenin ortalama yörüngeden geçme frekansı.

MAD: Ortalama açısal hareket (derece). Spermatozoon başının anlık dönüşleri sırasındaki yaptığı açısal değişikliğin ortalaması; şeklindedir (Organisation, 2010).

Çözünen örnekten 5 μl alınıp CASA sisteminin makler kamarasına yerleştirildi. Farklı alanlardan 5 görüntü kaydedildi ve spermatozoonların yukarı da yer alan motilite parametreleri kaydedildi.

3.2.1.2. Eozin-Nigrozin Boya Hazırlanması

- 0.67 gr Eozin Y
- 10 gr Nigrozin
- 0.9 gr NaCl
- 100 ml Distile su
- %0.9'luk NaCl (serum fizyolojik) hazırlamak için 100 ml distile suya 0.9 gr NaCl eklenip karıştırıldı.
- Hazırlanan %0.9'luk NaCl'e eosin Y eklenip karıştırıldı.
- Son olarak nigrosin boyası ilave edilip, ısıtılarak çözdürüldü. Boya kaynatıldıktan sonra oda sıcaklığında soğutuldu ve kurutma kağıdında filtre edildi.

3.2.1.3. Eosin-Nigrosin Boyama Yöntemi

- Eosin-Nigrosin boyasından 50 µl, dondurulmuş çözdürülmüş spermatozoon hücrelerinde 50 µl alınıp ayrı bir tüpte karıştırıldı.
- 30 saniye bekletildikten sonra 12 µl'lik damlalar lamlara yayıldı.
- Hava da kurutulduktan sonra preparasyonlar entellan ve lamel ile kapatıldı.
- X100'lik büyütmede incelendi.
- 200 adet spermatozoon sayıldı.
- Sağlam sitoplazma zarına sahip canlı hücreler, eozini sitoplazmalarına geçirmediği için beyaz olarak; ölü spermatozoonlar ise pembe olarak izlendi. Yüzde cinsinden canlı spermatozoonlar hesaplandı.

3.2.1.4. İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler IBM SPSS for Windows 11.5 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) programı kullanılarak gerçekleştirildi. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu görsel (histogram ve olasılık grafikleri) ve analitik yöntem Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Ön deneylerdeki canlılık yüzdeleri ve CASA'daki hareketlilik parametreleri normal dağılım göstermediği belirlendiğinden bu parametreler, gruplar arasında Friedman testi kullanılarak karşılaştırıldı. P-değeri 0.05'in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar şeklinde değerlendirildi.

3.2.2. Deneyler

Ön deneylerdeki CASA ve eosin nigrosin boyama sonuçlarına göre spermatozoonların dondurma medyumuna 0,25 mM kurkumin ve 25 µM koenzim Q10 eklenmesinin hücrelere toksik etki oluşturmadığı ve canlılık oranlarının diğer konsantrasyon gruplarına göre daha yüksek olması hücrelerin akrozom bütünlüğünü, DNA yapısını da daha iyi koruyabilecekleri ön görüşüyle deneylere bu konsantrasyonlarda devam edildi.

Deneyler için likefiye olmuş semen örneğinden 5 µl alınarak makler kamarasında spermatozoonların sayısı, hareketliliği ve morfolojik görünümü

değerlendirildi. Normal semen parametrelerine sahip örnekler 40/80 gradiyent medyumunda 300 g'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Altta kalan pelete 5 ml'lik spermatozoon yıkama medyumunu eklendi, 300 g'de 10 dakika santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırıldı. Altta kalan spermatozoon hücrelerinin bulunduğu pelet örneği 4 gruba ayrıldı ve antioksidanlı spermatozoon dondurma medyumunu ile 1:1 oranında kriyoviallerde (dondurma tüpleri) karıştırıldı.

Gruplar;

Grup 1: 0,5 ml Spermatozoon Süspansiyonu + 0,5 ml Spermatozoon dondurma medyumunu (SDM) (kontrol grubu),

Grup 2: 0,5 ml Spermatozoon Süspansiyonu + 0,5 ml SDM içerisinde çözündürülmüş kurkumin (toplam kurkumin konsantrasyonu 0.25 mM) (K Grubu)

Grup 3: 0,5 ml Spermatozoon Süspansiyonu + 0,5 ml SDM içerisinde çözündürülmüş koenzim Q10 (toplam koenzim Q10 konsantrasyonu 25 µM) (CoQ10 grubu)

Grup 4: 0,5 ml Spermatozoon Süspansiyonu + 0,5 ml SDM içerisinde çözündürülmüş kurkumin ve koenzim Q10 (toplam kurkumin konsantrasyon 0.25 mM ve toplam koenzim Q10 konsantrasyon 25 µM) (K+CoQ10 grubu), olarak belirlendi.

Vialler kapatıldıktan sonra hafif şekilde alt-üst edilerek dondurma medyumuyla karışması sağlandı ve sıvı azot buharına alındı. 30 dakika sıvı azot buharında tutulduktan sonra örnekler sıvı azota alındı.

Bir ay sonra örnekler sıvı azottan çıkarıldı ve 1 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 10 dakika kadar 37°C'lik sıcak su banyosuna alındı. Sonrasında tüplerin kapakları açılarak yıkama için santrifüj tüplerine aktarıldı ve üzerine fosfatlı tampon solüsyonu (PBS) eklenip 300 g'de 10 dakika santrifüj edildi, üstte kalan kısım atıldı.

3.2.2.1. CASA

- PBS'li spermatozoon hücrelerinden 5 µl alınıp CASA sisteminin makler kamarasına yerleştirildi.

- Farklı alanlardan 5 görüntü kaydedildi ve spermatozoonların motilite parametreleri kaydedildi.

3.2.2.2. Propidium Iodide (PI) Boyama Yöntemi ile Floresan Mikroskobi

- 2×10^6 / ml konsantrasyonunda spermatozoon hücresi eppendorf tüpünde PBS ile dilüe edildi.
- 300 g – 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantı atıldı.
- 500 µl PI boyama solüsyonunda eklendi ve 4°C’de 10 dakika inkübe edildi.
- Poli-L-Lizin kaplı lamalar Pap-pen ile çizildi.
- Boyanan hücreler lamalara damlatılıp yayıldı.
- Höchst solüsyonu damlatılıp lamel ile kapatıldı.
- X100 büyütmede, floresan mikroskobunda incelendi.

3.2.2.3. PI Boyama Yöntemi ile Akım Sitometrisi

- 2×10^6 / ml konsantrasyonunda spermatozoon hücresi eppendorf tüpünde PBS ile dilüe edildi.
- 300 g – 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantı atıldı.
- 500 µl PI boyama solüsyonunda eklendi ve 4°C’de 10 dakika inkübe edildi.
- Tüpteki hücreler akım sitometrisi ile analiz edildi.

3.2.2.4. PNA Boyama Yöntemi ile Floresan Mikroskobi

- 2×10^6 / ml konsantrasyonunda spermatozoon hücresi eppendorf tüpünde PBS ile dilüe edildi.
- 300 g – 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantı atıldı.
- 500 µl PNA boyama solüsyonunda eklendi ve 37°C’de 15 dakika inkübe edildi.
- Poli-L-Lizin kaplı lamalar Pap-pen ile çizildi.
- Boyanan hücreler lamalara damlatılıp yayıldı.
- Höchst solüsyonu damlatılıp lamel ile kapatıldı.
- X100 büyütmede, floresan mikroskobunda incelendi.

3.2.2.5. PNA Boyama Yöntemi ile Akım Sitometrisi

- 2×10^6 / ml konsantrasyonunda spermatozoon hücresi eppendorf tüpünde PBS ile dilüe edildi.
- 300 g – 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantı atıldı.
- 500 µl PNA boyama solüsyonunda eklendi ve 37°C’de 15 dakika inkübe edildi.
- Tüpteki hücreler analiz edildi.

3.2.2.6. Tunel (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Transferase Mediated Nick End-Labeling) Boyama Yöntemi ile Floresan Mikroskobi

- 5×10^6 /ml konsantrasyonunda spermatozoon hücresi eppendorf tüpünde PBS ile dilüe edildi.
- 300 g – 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı.
- Pelete fiksasyon solüsyonundan 100 µl eklenip 60 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- PBS ile yıkama yapıldı ve 300 g – 10 dakika santrifüj edilip, süpernatant kısmı atıldı.
- Geçirgenlik solüsyonunda 100 µl eklenip buz üzerinde 2 dakika bekletildi.
- PBS ile yıkama yapıldı ve 300 g – 10 dakika santrifüj edilip, süpernatant kısmı atıldı.
- Negatif kontrol: 50 µl Label solüsyonu
Tunel boyama: 50 µl Tunel Mix

60 dakika 37°C’de inkübe edildi.

Tunel Mix: 50 µl enzim Solüsyonu + 450 µl Label Solüsyonu şeklinde hazırlandı.

- PBS ile yıkandı
- Poli-L-Lizin kaplı lamalar Pap-pen ile çizildi.
- Negatif ve pozitif boyanan hücreler lamlara damlatılıp yayıldı.
- Höchst solüsyonu damlatılıp lamel ile kapatıldı.

- X100 büyütmede, floresan mikroskopla incelendi.

3.2.2.7. Tünel Boyama Yöntemi ile Akım Sitometrisi

- 5×10^6 /ml konsantrasyonunda spermatozoon hücresi eppendorf tüpünde PBS ile dilüe edildi.
 - 300 g – 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı.
 - Pelete fiksasyon solüsyonundan 100 µl eklenip 60 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
 - PBS ile yıkama yapıldı ve 300 g – 10 dakika santrifüj edilip, süpernatant kısmı atıldı.
 - Geçirgenlik solüsyonunda 100 µl eklenip buz üzerinde 2 dakika bekletildi.
 - PBS ile yıkama yapıldı ve 300 g – 10 dakika santrifüj edilip, süpernatant kısmı atıldı.
 - Negatif kontrol: 50 µl Label solüsyonu
- Tünel boyama: 50 µl Tünel Mıx
- 60 dakika 37°C’de inkübe edildi.

Tünel Mıx: 50 µl Enzim Solüsyonu + 450 µl Label Solüsyonu şeklinde hazırlandı.

- PBS ile yıkandı
- Akım sitometrisinde incelendi.

3.2.2.8. TAS (Total Antioksidan Seviyesi) Çalışma Yöntemi

Spermatozoon örnekleri çözme işlemi yapıldıktan sonra homojenizatör cihazında hücrelerin parçalanma işlemi yapıldı. Kriyoviallerdeki örnekler eppendorf tüplerine aktarıldı. 1600 RPM’de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı başka bir eppendorf tüpüne ayrıldı ve numaralandırıldı.

Örneklerin çalışılma prensibi: Örnekteki antioksidanlar, koyu mavi-yeşil renkli ABTS radikal solüsyonunu, renksiz ABTS formuna çevirir. 660 nm absorbandaki

değişim total antioksidan miktarıyla alakalıdır. Kitin kalibrasyonu E vitamini benzeri Trolox Equivalent adı verilen stabil antioksidan standardı ile yapılır.

Bileşenler: Tüm reaktifler ve standartlar kullanıma hazırdır.

Reagent 1		Buffer Solution
Acetate Buffer		0.4 mol/L pH 5.8
Reagent 2		Prochromogen Solution
ABTS		30 mmol/L
Standard	Trolox	1 mmol / L
QC Level 1	Trolox	0.5 mmol / L
QC Level 2	Trolox	2.0 mmol / L

Örnekler Relassay kiti ile Mindray BS300 cihazında tam otomatik olarak çalışıldı. Otomatik cihaz tarafından Reaktif 1'den 300 µl alındı, numuneden 18 µl alındı ardından küvet içinde karıştırılıp 30 saniye sonra ilk okuma 660 nm yapıldı ardından reaktif 2'den 45 µl karıştırıldı ve inkübatörde 5 dakika bekletilip ikinci okuma 660 nm yapıldı.

3.2.2.9. TOS (Total Oksidan Seviyesi) Çalışma Yöntemi

Kriyoviallerdeki spermatozoon örneklerine çözme işlemi yapıldıktan sonra homojenizatör cihazında hücrelerin parçalanma işlemi yapıldı. Kriyoviallerdeki örnekler eppendorf tüplerine aktarıldı. 1600 RPM'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı başka bir eppendorf tüpüne ayrıldı ve numaralandırıldı.

Örneklerin çalışılma prensibi: Örnekteki oksidanlar ferrik iyonla tümleşik ferröz iyon-kıskacını oksitler. Ferrik iyon asidik ortamda kromojen ile renkli bir bileşik oluşturur. Spektrofotometrede ölçülen rengin koyuluğu numunedeki oksidan moleküllerinin toplam miktarını verir. Kitin kalibrasyonu hidrojen peroksit ile yapılır, sonuçlar litre başına düşen mikromol hidrojen peroksit olarak verilir. (µmol H₂O₂ Equiv./L)

Bileşenler: Tüm reaktifler ve standartlar kullanıma hazırdır.

Reagent 1	Buffer Solution	
H ₂ SO ₄	25 mM pH 1.75	
Reagent 2	Substrate Solution	
H ₂ SO ₄	25 mM pH 1.75	
Ferrous ion	5 mM	
O-dianisidine	10 nM	
Standard	H ₂ O ₂	10 µmol/L
QC Level 1	H ₂ O ₂	5 µmol/L
QC Level 2	H ₂ O ₂	20 µmol/L

Örnekler Relassay kiti ile Mindray BS300 cihazında tam otomatik olarak çalışıldı. Otomatik cihaz tarafından Reaktif 1'den 300 µl alındı, numuneden 45 µl alındı ardından küvet içinde karıştırılıp 30 saniye sonra ilk okuma 530 nm yapıldı ardından reaktif 2'den 15 µl karıştırıldı ve inkübatörde 5 dakika bekletilip ikinci okuma 530 nm yapıldı.

3.2.2.10. İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler IBM SPSS for Windows 11.5 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) programı kullanılarak gerçekleştirildi. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu görsel (histogram ve olasılık grafikleri) ve analitik yöntem Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Deneylerde yapılan CASA'daki hareketlilik parametreleri; akım sitometrisi Propidium Iodide (canlılık), Peanut Agglutinin (akrozom bütünlüğü) ve TUNEL (DNA hasarı) pozitif boyanma yüzdeleri, total antioksidan ve total oksidan seviyeleri normal dağılım göstermediği belirlendiğinden bu parametreler, gruplar arasında Friedman testi kullanılarak karşılaştırıldı. P-değeri 0,05'in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar şeklinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Ön Deneyler:

10 kişiden alınan semen örneklerinin herbiri kontrol ve antioksidanlı olarak dokuz farklı grup şeklinde dondurma çözme işlemi yapıldı. Hareketlilikleri CASA cihazıyla, canlılıkları histolojik eozin nigrosin boyama yöntemiyle değerlendirildi.

4.1.1. CASA

Gruplardaki dondurma çözme sonrası spermatozoonların hareketlilik ortalama değerleri Tablo 4.1. yer almaktadır. Bu sonuçlara göre, kurkumin ve koenzim Q10 gruplarının kontrol grubuyla ayrı ayrı karşılaştırılması sonucunda 1 mM kurkumin dozunun ileri hareketlilik ve LIN değerleri ile 1,5 mM kurkumin VSL değeri kontrole göre anlamlı azalış gösterirken, BCF değerinde 1 mM kurkumin ve 100 µm koenzim Q10 de anlamlı derecede artış görülmüştür.

Tablo 4.1. Spermatozoon Hareketlilik Parametreleri. Spermatozoonların dondurma çözme sonrası CASA'daki hareketlilik parametreleri. * p<0.05, ** p<0.001, kontrol gruplarına göre anlamlıdır.

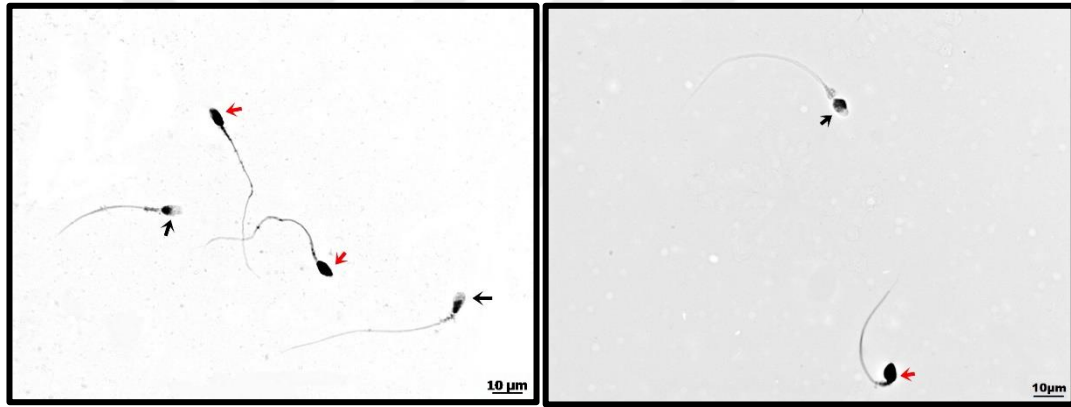
	İleri Hareketliliği k (a) %	Yerinde Hareketliliği k (b) %	Hareketsiz %	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	ALH (µm/s)	LIN %	WOB %	STR %	BCF (Hz)
<i>Kontrol</i>	11,79	1,75	86,46	69,63	24,25	33,48	4,39	33,77	48,70	67,14	18,47
<i>Kurkumin 0.25 mM</i>	7,16	3,39	89,45	51,31	16,77	25,44	3,46	27,32	45,11	53,59	20,77
<i>Kurkumin 0.5 mM</i>	8,76	3,89	87,35	61,07	18,59	29,04	4,47	32,46	49,91	62,21	19,09
<i>Kurkumin 1 mM</i>	6,15*	2,75	91,10	73,60	19,40	33,98	4,63	25,83*	46,29	54,15	37,98**
<i>Kurkumin 1.5 mM</i>	6,36	3,35	90,29	58,58	14,66*	26,77	3,90	29,89	49,29	57,39	30,60
<i>Koenzim Q10 25 µM</i>	7,95	2,57	89,48	74,69	20,01	31,14	4,56	29,86	46,80	61,40	22,64
<i>Koenzim Q10 50 µM</i>	10,70	3,06	86,23	61,14	18,30	29,44	3,82	31,89	48,67	62,44	28,63
<i>Koenzim Q10 100 µM</i>	9,46	3,37	87,15	68,86	20,24	32,56	4,78	30,48	49,12	59,31	29,11*
<i>Koenzim Q10 150 µM</i>	8,52	2,80	88,69	69,69	21,98	32,73	4,33	31,10	48,17	57,22	21,64

4.1.2. Eozin Nigrosin Boyama

Spermatozoon dondurma çözme sonrası yayma preparasyonları yapıldı ve histolojik eosin nigrosin yöntemiyle boyandı (Şekil 4.1.). Her gruptaki preparatlardan en az 200 hücre sayıldı ve canlılık yüzdeleri belirlendi (Tablo 4.2). Bütün gruplar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında canlılık yüzdeleri anlamlı değildi.

Tablo 4.2. Spermatozoonların dondurma çözme sonrası canlılık yüzdeleri. $p > 0.05$; bütün gruplar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında canlılık yüzdeleri anlamlı değildi.

	canlı %	ölü %
Kontrol	42	58
Kurkumin 0.25 mM	<u>40</u>	<u>60</u>
Kurkumin 0.5 mM	28	72
Kurkumin 1 mM	33	67
Kurkumin 1.5 mM	29	71
Koenzim Q10 25 μ M	<u>34</u>	<u>66</u>
Koenzim Q10 50 μ M	26	74
Koenzim Q10 100 μ M	30	70
Koenzim Q10 150 μ M	30	70



Şekil 4.1.. Spermatozoonların dondurma çözme sonrası eosin-nigrosin boyanması. Kırmızı ok, canlı hücreler; siyah ok, ölü hücreler.

Grupların canlılık ve hareketlilik parametreleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak değerlendirildi. 1 mM kurkumin ve 100 μ M koenzim Q10'un kinetik BCF parametresinde artış görülmüştür. BCF, spermatozoon kafa hareketi yönündeki değişikliklere olan duyarlılık (kuyruk atımının bir sonucu olarak) artmıştır. Bu değişken, ortalama yoldaki baş spermatozoon salınımlarının sıklığı ile ilişkilidir (Valverde et al., 2019). BCF değerlerinin bu gruplarda yüksek olmasının yanında literatürde BCF değerinin klinik öneminin bilinmemesi, Dünya Sağlık Örgütü'nün tüm CASA cihazlarındaki ölçüm kriterlerinin henüz ortak bir değerde bütünleşmemesini

belirtmesi, 1 mM kurkuminde ileri hareketliliğin kontrole göre anlamlı derecede düşük olması ve 100 µM canlı yüzdelерinin azalmış olması nedeniyle bu gruplar deneylere dahil edilmemiştir (Organisation, 2010). Uygun doz, canlılık ve hareketlilik parametreleri daha iyi olan 0,25 mM kurkumin ve 25 µM koenzim Q10 grupları olarak belirlenmiş ve deneylere bu dozlarda devam edilmiştir.

4.2. Deneyler

4.2.1. CASA

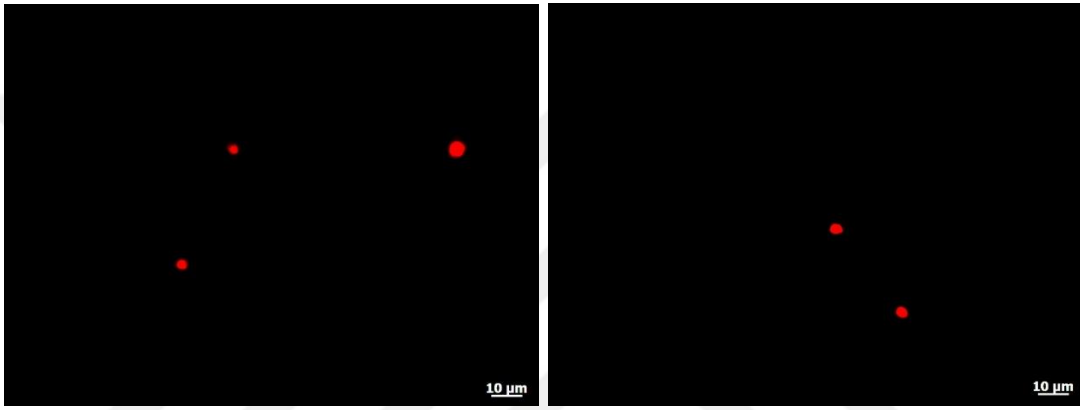
Dondurma çözme sonrası spermatozoon hareketliliklerinin CASA sonucu, CoQ10 grubunda ileri hareketliliğinin kontrol ve kurkumin gruplarına göre anlamlı şekilde arttığı tespit edildi. Hareketsiz spermatozoon yüzdesinde CoQ10 grubunda kontrol ve kurkumin gruplarına göre düşüktü. CASA verilerinin median değerleri Tablo 4.3.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Spermatozoonların dondurma çözme sonrası CASA parametrelerinin median değerleri. * Kontrol ve kurkumin gruplarına göre $p \leq 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı fark vardır.

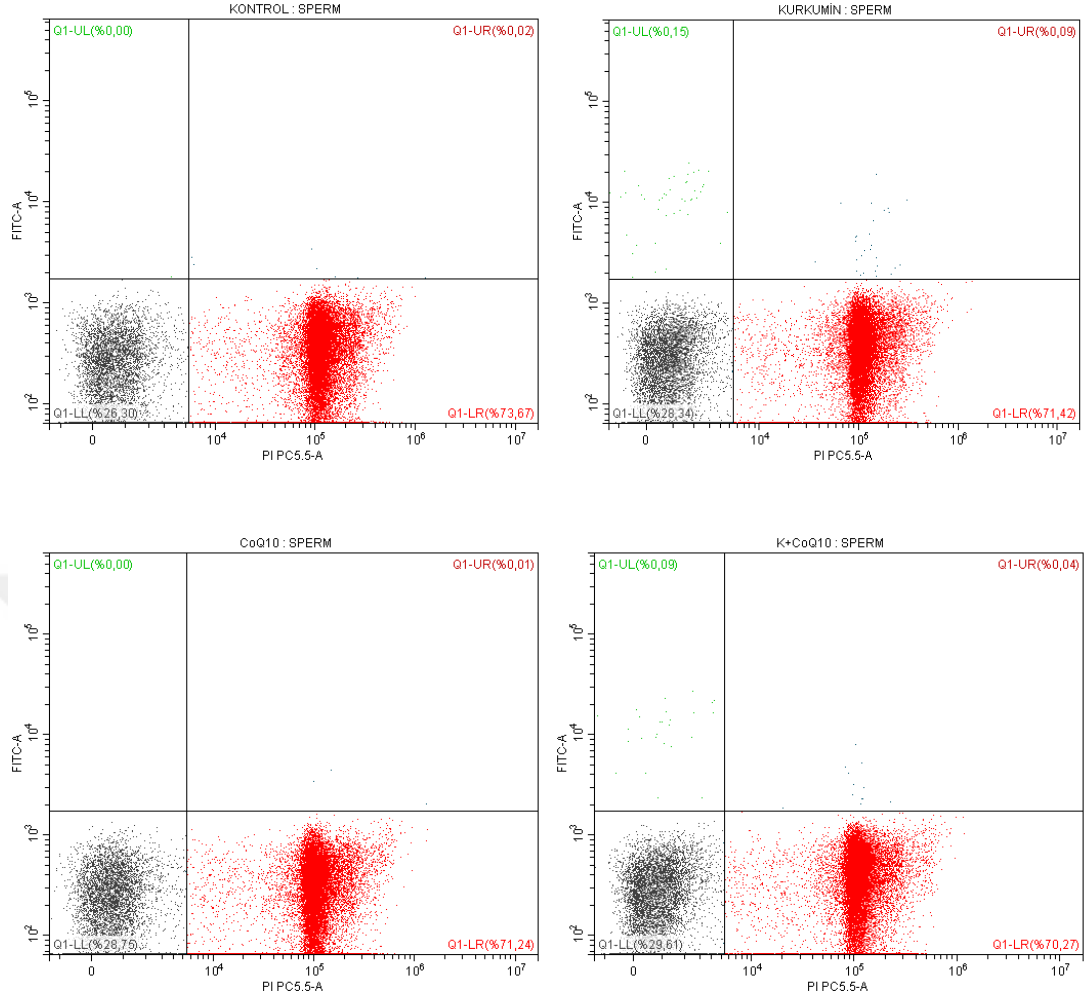
	İleri Hareketlilik (a) %	Yerinde Hareketlilik (b) %	Hareketsiz %	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	ALH (µm/s)	LIN %	WOB %	STR %	BCF (Hz)
Kontrol	5,03	14,08	78,75	24,34	5,98	10,65	0,58	26,12	48,35	52,94	49,97
Kurkumin	5,48	15,14	78,26	20,7	5,66	9,65	0,62	26	47,14	53,37	44,6
CoQ10	7,55*	17,8	73,75*	23,2	6,84	10,58	0,65	28,08	48,93	56,73	45,2
Kurkumin + CoQ10	5,69	13,99	76,87	24,16	5,43	9,91	0,64	27,58	48,35	53,39	49,15

4.2.1. Propidium Iodide (PI) İmmunfloresan İşaretlenmesi ve Akım Sitometrisi Analizi

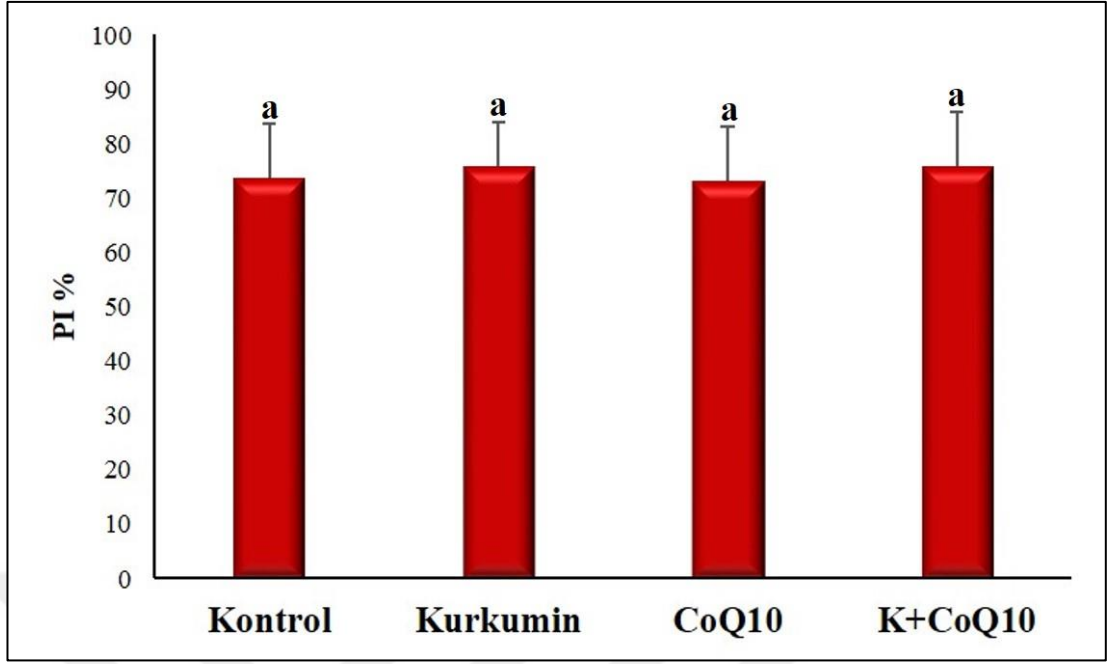
Çözme sonrası spermatozoonların PI immunfloresan boyama ve akım sitometri değerleri sonucu bütün grupların kontrole göre ölü hücre yüzdelerinde bir fark görülmedi. PI boyama immunfloresan, akım sitometrisi görüntüsü ve değerleri Şekil 4.2., Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Çözme sonrası PI boyası floresan mikroskobi görüntüsü. Orijinal Büyütme X100



Şekil 4.3. Çözme sonrası PI boyası akım sitometrisi görüntüsü.



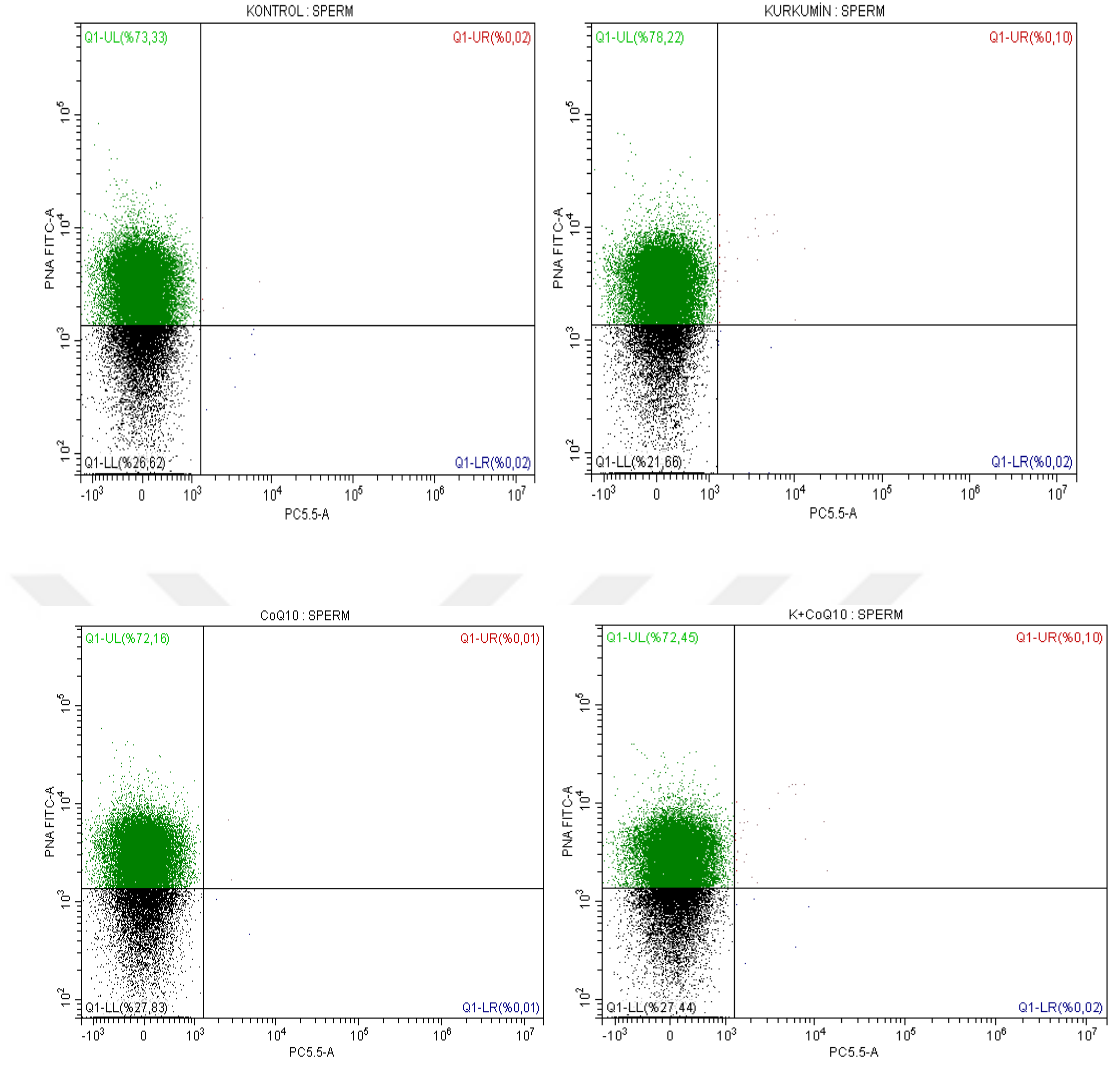
Şekil 4.4. Çözme sonrası PI boyası akım sitometrisi median değerleri. a; $p > 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı değildir.

4.2.2. PNA İmmunfloresan İşaretleme ve Akım Sitometrisi Analizi

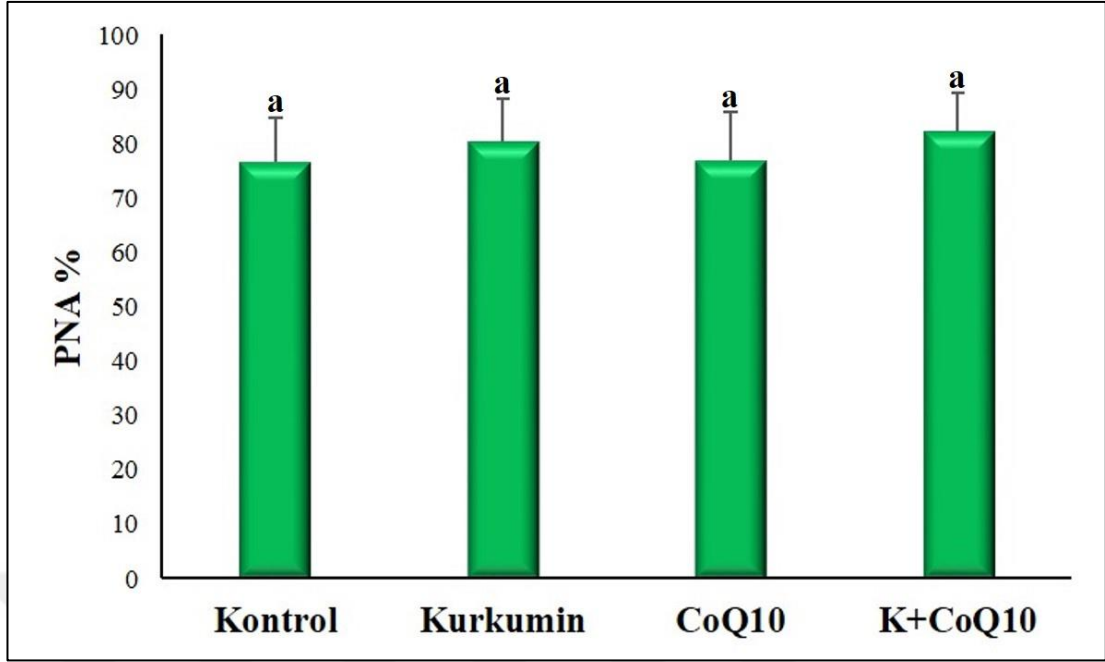
Çözme sonrası spermatozoonların akrozom bütünlüğünün değerlendirilmesi için yapılan PNA boyasının immunfloresan ve akım sitometrisi sonucu bütün grupların kontrole göre akrozom bütünlüğü yüzdelerinde bir fark görülmedi. PNA boyama immunfloresan, akım sitometrisi görüntüsü ve değerleri Şekil 4.5., Şekil 4.6. ve Şekil 4.7.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Çözme sonrası PNA boyası immunfloresan görüntüsü. Orijinal Büyütme X100



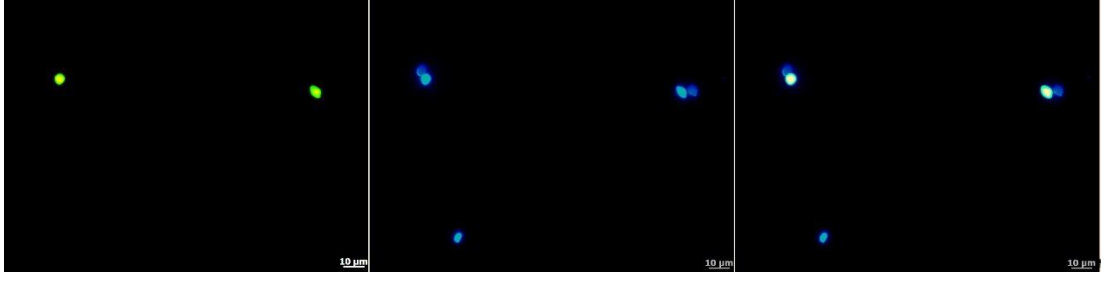
Şekil 4.6. Çözme sonrası PNA boyası akım sitometri görüntüsü.



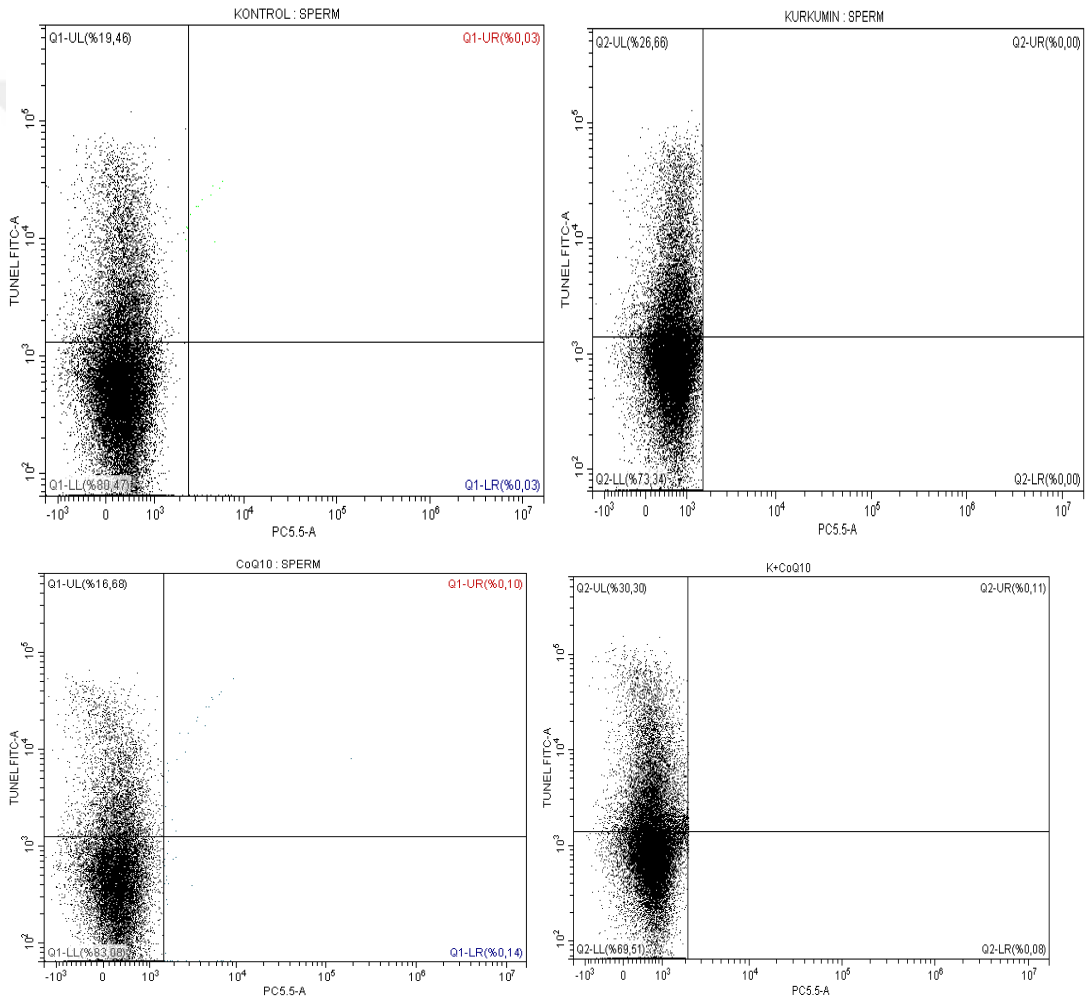
Şekil 4.7. Çözme sonrası PNA boyası akım sitometri median değerleri. a; $p > 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı değildir.

4.2.3. TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick end Labeling) İmmunfloresan İşaretleme ve Akım Sitometrisi Analizi

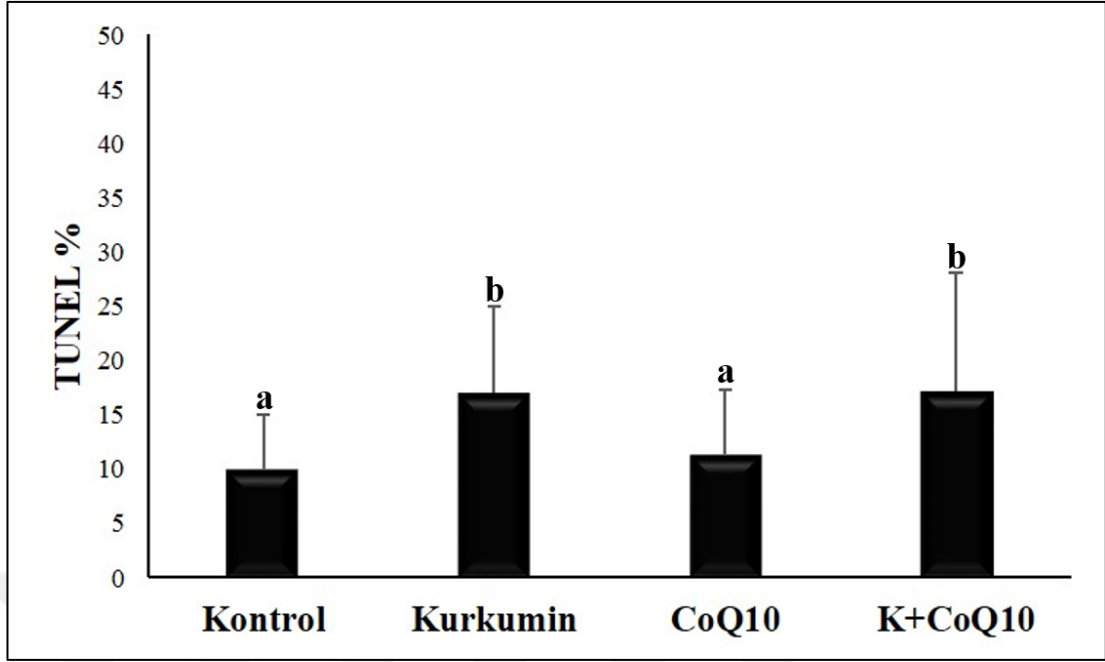
Çözme sonrası spermatozoonlardaki DNA hasarının değerlendirilmesi için yapılan TUNEL boyasının immunfloresan ve akım sitometrisi sonucu kurkumin ve K+CoQ10 gruplarının hem kontrole hem de CoQ10 grubuna göre anlamlı derecede pozitif boyandığı görüldü. Kontrol ve CoQ10 grupları birbirine göre benzer DNA hasarı oluşturdu. TUNEL boyama immunfloresan, akım sitometrisi görüntüsü ve değerleri Şekil 4.8., Şekil 4.9. ve Şekil 4.10.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Çözme sonrası TUNEL boyası immunfloresan görüntüsü. Orijinal Büyütme X100



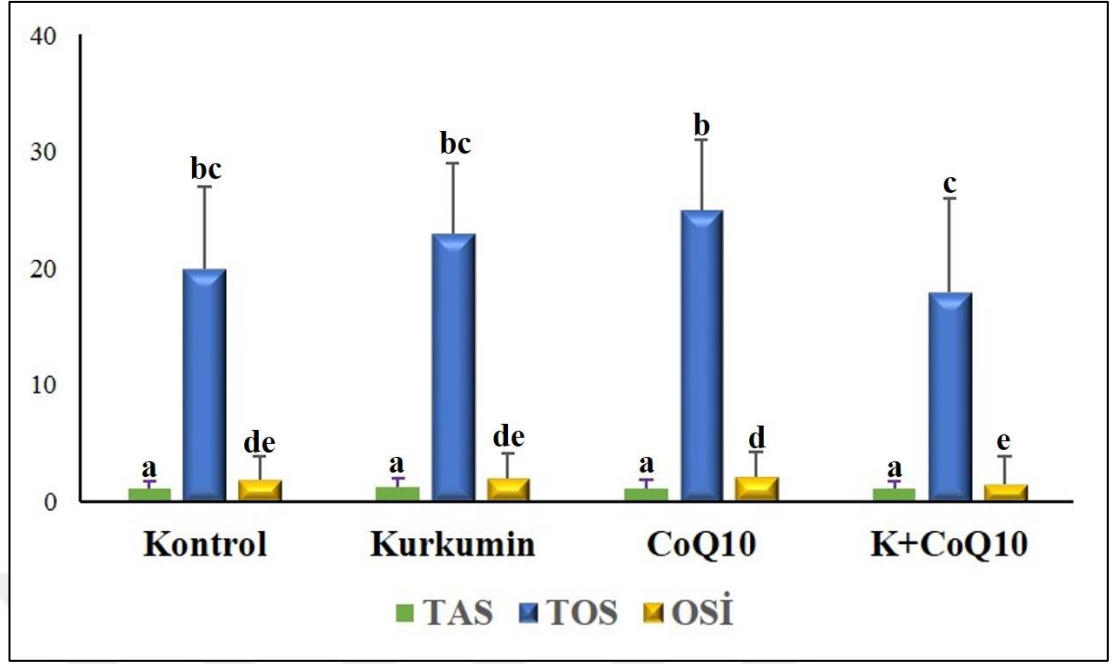
Şekil 4.9. Çözme sonrası TUNEL boyası akım sitometri görüntüsü.



Şekil 4.10. Çözme sonrası TUNEL boyası akım sitometri median değerleri. Farklı harfler, $p \leq 0,05$ istatistiksel olarak anlamlıdır.

4.2.4. Total Antioksidan Seviyesi (TAS) – Total Oksidan Seviyesi (TOS) Analizi

Çözme sonrası spermatozoonların homojenizasyonundan sonra oluşan TAS ve TOS analizi sonucu bütün grupların antioksidan ve oksidan kapasitelerinde kontrole göre anlamlı bir fark tespit edilmedi. K+CoQ10 grubundaki TOS ve OSİ değerlerinin CoQ10 grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu belirlendi. Biyokimyasal TAS ve TOS değerleri Şekil 4.11.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.11. Çözme sonrası TAS, TOS ve OSİ median değerleri. Farklı harfler, $p \leq 0,05$ istatistiksel olarak anlamlıdır.

5. TARTIŞMA

Spermatozoon kriyoprezervasyonu, insanda ve evcil hayvanlarda erkek fertilitésinin korunması ve yönetimi için etkili bir yoldur. Kemoterapi ve radyoterapi gibi sitotoksik tedaviler buna ilaveten cerrahi tedaviler testis yetmezliğine veya ejakülatör fonksiyon bozukluğuna yol açabilir. Bu gibi durumlarda, spermatozoonların dondurularak korunması doğurganlığın sürdürülebilmesi için önemli bir çözümdür. Donmuş çözülmüş semen intrauterin inseminasyon (IUI), IVF veya intrasitoplazmik spermatozoon enjeksiyonu (ICSI) için kullanılır (Hezavehei et al., 2018).

Pratik uygulamalarda donmuş çözülmüş semen, üreme tedavilerinde kullanılmasına rağmen; soğutma, dondurma ve çözölmeyi içeren kriyoprezervasyon işlemlerinin hücre üzerinde ciddi zarar verici değışikliklere neden olması, istenen oranda başarıyı sağlamamaktadır (Amidi et al., 2016). Spermatozoonlarda çözme sonrası canlılık ve hareketlilikte azalma, akrozomal değışiklikler, subakrozomal şişme, membran lipid kompozisyonundaki değışiklikler, mitokondriyon hasarlanmasının yanında DNA hasarında da artış gibi etkiler bilinmektedir (Wang et al., 2014, Ozkavukcu et al., 2008, O'Connell et al., 2002, Liu et al., 2016). Kriyoprezervasyon hasarının arkasındaki mekanizma; ozmotik stres, soğuk şok, hücre içi buz kristali oluşumu, aşırı reaktif oksijen türlerinin üretimi (ROS), antioksidan savunma sistemlerindeki değışiklikler ve bu koşulların kombinasyonları ile ilişkili olabilir (Amidi et al., 2016).

Son yıllarda kriyoprezervasyonun oluşturduğu hasarı engellemek için KPA'larla beraber antioksidan maddelerin kullanımı ön plana çıkmıştır. Buradan yola çıkarak çalışmamızda, literatürde antioksidan oldukları bilinen kurkumin ve koenzim Q10 maddeleri kriyoprezervasyon işleminde kullanıldı ve bu antioksidanların spermatozoonlar üzerindeki etkileri incelendi.

Çalışmamızda ön deneyler aşamasında kurkumin ve koenzim Q10 antioksidanları ayrı ayrı ve farklı dozlarda kriyoprezervasyon işleminde kullanıldı. Bu ön deneylerin sonucunda canlılık ve hareketlilik parametrelerinde anlamlı bir değışiklik tespit edilmedi. Çalışmaya canlılık yüzdeleri en yüksek konsantrasyonlar

olan 0,25 mM kurkumin ve 25 µM koenzim Q10 grupları ve ayrıca bunların ikisinin de birlikte kullanıldığı gruplar olmak üzere üç grupta devam edildi.

Tablo 5.1. Deney Sonuçları

	Kontrol	Kurkumin	CoQ10	K+CoQ10
Hareketlilik (CASA)	✓	✓	✓✓	✓
Canlılık (PI)	X	X	X	X
Akrozom Bütünlüğü (PNA)	✓	✓	✓	✓
DNA Hasarı (TUNEL)	✓	✓✓✓	✓	✓✓✓
Total Antioksidan Seviyeleri (TAS)	-	-	-	-
Total Oksidan Seviyeleri (TOS)	++	++	+++	+
Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)	++	++	+++	+

İleri Hareketlilik Yüzdesi: ✓ düşük ✓✓ orta ✓✓✓ yüksek

Akrozom Bütünlüğü ve DNA Hasarı Yüzdesi: ✓ düşük ✓✓ orta ✓✓✓ yüksek

Canlılık Yüzdesi: X düşük XX orta XXX yüksek

Total Antioksidan Seviyeleri: - düşük -- orta --- yüksek

Total Oksidan Seviyesi ve Oksidatif Stres İndeksi: + düşük ++ orta +++ yüksek

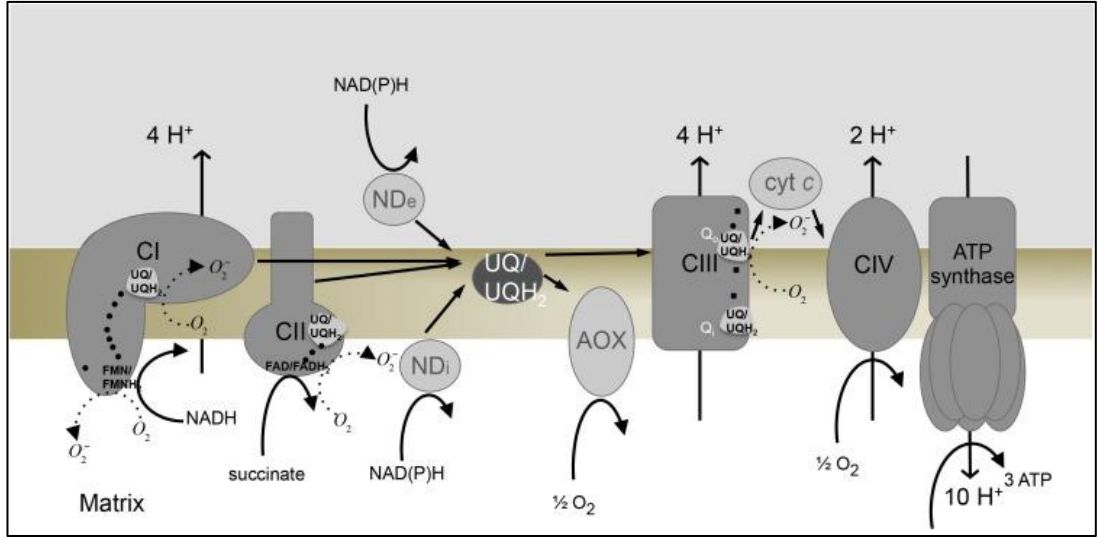
Belirlenen konsantrasyonlarda kriyoprezervasyon işleminin ardından sonuçlar (Tablo 5.1.); gruplar arasında canlılık yüzdelerine bakıldığında bütün gruplar kontrolle kıyaslandığında benzer canlılık yüzdelerine sahipti. Hareketlilik parametresi olan ileri hareketli spermatozoon yüzdesi koenzim Q10 grubunda kontrole ve kurkumin gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulundu. Akrozom bütünlüklerine bakıldığında bütün gruplarda PNA ile korunmuşluk benzer bulundu. DNA hasarı yüzdesi, hem kurkumin hemde K+CoQ10 grubunda kontrole ve CoQ10 grubuna göre anlamlı derecede yüksekti. Kontrol grubuyla CoQ10 grubu birbirine göre benzer DNA hasarı yüzdesine sahipti. Bütün grupların total antioksidan seviyelerinde bir fark tespit edilmedi. Total oksidan seviyelerinde ise kontrolle karşılaştırıldıklarında

gruplarda anlamlı farklılık yoktu ancak gruplar tek tek birbiri ile kıyaslandığında koenzim Q10 grubunun K+CoQ10 grubuna göre daha yüksek oksidasyon seviyelerine sahip olduğu belirlendi.

Kriyoprezervasyon işleminde oluşan buz kristalleri membran bütünlüğünün ve organel fonksiyonlarının bozulmasına neden olur. Plazma membranında temel olarak bulunan fosfolipid ve kolesterol, düşük sıcaklıklarda zara daha fazla akışkanlık kazandırırken, kriyoprezervasyon sırasındaki soğutma işlemi membran lipid faz geçişini artırır ve membran proteinlerinin bozulmasına neden olur (Di Santo et al., 2012). Membran bütünlüğünün bozulması, hücre canlılığının kaybıyla sonuçlanır.

Antioksidan maddeler kriyoprezervasyon işleminde membran bütünlüğünün korunmasını sağlamak ve hücre canlılığının korunmasına yardımcı olmaktadır. Masoudi ve ark. CoQ10'u kriyoprezervasyonda kullandığında horoz spermatozoon hücresinin canlılıklarını daha iyi korunduğunu tespit etmiştir (Masoudi et al., 2018). Chanapiwat ve ark.'nın farklı konsantrasyonlarda kurkumin antioksidanı kullanılarak yaptığı domuz spermatozoonu kriyoprezervasyon çalışmasında ise hücre canlılığını etkilemediği bulunmuştur (Chanapiwat and Kaeoket, 2015). Bizde çalışmamızda kurkumin ve CoQ10'un hücre canlılığının korunmasında etkili olmadıklarını belirledik. Antioksidanların birlikte kullanılmasında canlılığın korunmasını etkilemediğini gösterdik.

Mitokondriyonlar iç ve dış zarlardan oluşan bir çift zar sistemiyle sınırlanmıştır. İç zarın kıvrımları matriksin içine doğru uzanır. NADH (Nikotinamid Adenin Dinükleotit), mitokondriyon matriksinde Krebs döngüsünde oluşur. NADH ile gelen elektronlar, elektron taşıma zincirine kompleks I'den girer. Bu elektronlarda daha sonra koenzim Q10 aracılığıyla kompleks III'e aktarılır ve son olarak sitokrom c tarafından, O₂'ye akıtılacakları yer olan kompleks IV'e taşınır. Kompleks I,III ve IV'deki elektron aktarımında serbest enerjide düşüş olur bu da protonların matriksten zarlar arası boşluğa çıkmasında kullanılır. Sonuçta iç zarın iki yanında bir proton gradiyenti oluşur. Proton gradiyentinde saklanan enerji, protonların kompleks V içerisinden matrikse geri dönüşü sırasında ATP sentetaz enzimi aracılığıyla ATP üretimi için kullanılır (Cooper, 2016) (Şekil 5.1.) (Larosa and Remacle, 2018).



Şekil 5.1. Elektron taşıma sistemi.

Koenzim Q10, elektron taşıma zincirinin (ETZ) elektronlarını, kompleks I / II'den III'e taşıyan kritik bir bileşendir. Koenzim Q10, süperoksit anyonunu ve peroksitleri temizleyerek lipidleri korumakta ve aynı zamanda adenozin trifosfat üreten mitokondriyal ETZ'ye yardımcı olmaktadır. CoQ10, özellikle metabolizma hızı yüksek ve mitokondriyon aktivitesi fazla organlarda yüksek seviyelerde bulunmaktadır. Hücrelerdeki mitokondriyon sayısı, büyüklüğü ve yapısı bu seviyeyi belirler. Mitokondriyal disfonksiyona sahip hastalarda CoQ10 tedavisinin organlardaki semptomları iyileştirdiği de gösterilmiştir. İnfertiliteyle ilgili olarak CoQ10'nun oral takviye şeklinde verildiği bir çok klinik çalışmada, spermatozoon hareketlilik parametrelerinin arttığı, morfolojilerinin iyileştiği ve antioksidan aktivitelerinin yükseldiği gösterilmiştir (Barcelos and Haas, 2019, Alahmar, 2018). Bu sonuçların özellikle CoQ10'un mitokondriyal aktiviteyi arttırmasıyla ilgili olduğu düşünülmektedir.

Carneiro JAM. ve ark.'ı semen örneklerinin dondurulup çözülmesi işleminde koenzim Q10'un spermatozoon hareketlilik parametrelerine olan etkisini çalışmış ve dondurulma öncesi yıkama sırasındaki santrifüje eklenen CoQ10'un motiliteyi arttırdığı gösterilmiştir (Carneiro et al., 2018). Bu çalışmadan farklı olarak çalışmamızda CoQ10 kriyoprotektan içinde kullanılmış ve literatürü destekleyici olarak spermatozoon ileri hareketlilik parametresini arttırmıştır.

Çalışmalarda, kurkuminin; spermatozoon membran potansiyelinde değişime neden olduğu, spermatozoon hareketliliği ve işlevinde rol oynadığı gösterilmiş, membran hiperpolarizasyonuna neden olarak hücrenin motilitesini azalttığı belirtilmiştir (Naz, 2014). Spermatozoon kriyoprezervasyonunda ise motiliteyi artırıcı etkisi gösterilmiş ve bu sonuç oksidatif stresi azaltmasıyla ilişkilendirmiştir (Shah et al., 2017). Çalışmamızda ise kurkuminin hareketlilik parametrelerine anlamlı bir etkisi olmamıştır.

Bucak ve ark. boğa semen kriyoprezervasyonu sonrası kurkuminin membran bütünlüğünü koruduğu ancak akrozom bütünlüğünü korumada ise anlamlı bir fark göstermediğini belirtirmiş (Bucak et al., 2012), bizde çalışmamız da bu sonucu destekledik. Kurkumin insan semen kriyoprezervasyonunda akrozom bütünlüğünün korunmasında kontrol ile kıyaslandığında bir etki göstermemiştir.

Koenzim Q10'un hareketliliği arttırmasının yanında canlılığı ve akrozom bütünlüğünü de koruduğu çalışmalarda gösterilmiştir (Masoudi et al., 2018). Çalışmamızda ise akrozom bütünlüğünü korumada anlamlı bir artış görülmemiştir.

Spermatozoon DNA hasarının etiyolojisi çok faktörlüdür. Primer testiküler veya sekonder (örn. çevresel) faktörlere bağlı olabilir. Spermatozoon DNA hasarının, spermatogenez sırasında anormal protamin ekspresyonu, aşırı ROS (reaktif oksijen türleri) oluşumu ve başarısız apoptozisin sonucu olduğuna inanılır. İnsan spermatozoasının oksidatif strese duyarlılığı, esas olarak spermatozoon plazma membranındaki doymamış yağ asitlerinin çokluğundan kaynaklanmaktadır. Bu doymamış yağ asitleri, membran füzyon olayları (örn. akrozom reaksiyonu ve spermatozoon-ovosit etkileşimi) ve spermatozoon hareketliliği için gerekli olan akışkanlığı sağlar. Bununla birlikte, bu moleküllerin doymamış doğası, onları serbest radikal saldırılarına ve spermatozoon plazma membranı boyunca devam eden lipid peroksidasyonuna yönlendirir. Bu işlem başlatıldıktan sonra spermatozoon yüzeyinde lipid peroksitlerin birikimi meydana gelir ve DNA'da oksidatif hasar oluşabilir.

Spermatozoon DNA hasarı ile semen ROS arasındaki ilişki, spermatozoon DNA hasarının tedavisinde antioksidanların kullanımının temelini oluşturmaktadır (Zini et al., 2009). Spermatozoon kriyoprezervasyonunda kullanılan antioksidan maddelerin,

hücrelerde canlılık ve motilite parametrelerini iyileştirdiği ve DNA hasarını da azalttığı gösterilmiştir (Aghaz et al., 2018). Sıçan spermatozoonlarının kriyoprezervasyon işleminde kurkuminin kullanılmasının DNA bütünlüğünü ve total antioksidan kapasitesini arttırdığı gösterilmiş (Soleimanzadeh and Saberivand, 2013, Shah et al., 2017) olsa da insan semeni üzerinde yaptığımız bu çalışmada tersine bir bulgu elde edilerek antioksidan kapasiteyi etkilemediği ve DNA hasarını da anlamlı derecede arttırdığı sonucuna ulaşılmıştır. Bunun yanında K+CoQ10 grubu da kurkumin grubuna benzer şekilde DNA hasarını arttırmıştır.

Aşırı ROS seviyelerinin neden olduğu DNA hasarı, spermatozoon hücresinin apoptozis sürecini hızlandırabilir ve canlı spermatozoa yüzdesinde düşüşe yol açabilir. CoQ10'un antioksidan özellikleri, mitokondriyon ve plazma membranında düşük oksidatif strese ve spermatozoanın DNA bütünlüğünü korumasına yardımcı olabilir. Yousefian I. ve ark. yaptığı çalışma 1 μ M konsantrasyonunda CoQ10'un spermatozoonların motilite ve kinetik parametrelerini, mitokondriyal aktiviteyi arttırdığı, plazma membran bütünlüğünü koruduğu ve DNA fragmentasyon indeksini düşürdüğünü göstermiştir (Yousefian, 2018). Dondurma çözme işlemlerinde CoQ10 kullanılması; koç (Daghigh Kia et al., 2017), aygır (Yousefian et al., 2014), bufalo ve sığır (Wafa, 2016) spermatozoonlarının plazma membran bütünlüğünde ve işlevselliğinde iyileşmeler sağlamıştır. Ancak bizim çalışmamızda CoQ10'un insan spermatozoon hücrelerinin DNA hasarının korunması yönünde bir etkisi olmadığı saptanmıştır.

Seminal plazmada, enzimatik antioksidanların (örneğin, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz) yanı sıra çeşitli non-enzimatik antioksidanlar (örneğin askorbat, ürat, E vitamini, piruvat, glutatyon, taurin ve hipotaurin) da bulunmaktadır. Biyolojik sıvılar, tek tek antioksidanların ölçülmesiyle veya toplam kümülatif ve sinerjik etkileri ile değerlendirilir. Bir sonra ki kavram, toplam antioksidan kapasitesidir ve düşük seminal TAS seviyesinin erkek infertilitesinde kilit bir rol oynadığı bilinir. Seminal plazmada total antioksidan durumunun değerlendirilmesi, infertil erkeklerde spermatozoon üreme kapasitesi ve fonksiyonel yeterliliğin değerlendirilmesini iyileştirmede değerli bir araç olarak önerilmiştir (Ajina et al., 2017).

Kriyoprezervasyonda, seminal plazmadaki total antioksidan kapasitesinin yüksek olması spermatozoon kalitesini olumlu yönde etkiler (Gurler et al., 2015). Semen dondurma işlemi sırasında kurkumin kullanımı ile total antioksidan seviyelerinin daha iyi korunduğu belirlenmiştir (Soleimanzadeh and Saberivand, 2013). Bizim sonuçlarımızda kurkumin total antioksidan seviyesini kontrol grubuna göre arttırmamış, spermatozoon kalitesine de etkisi belirlenmemiştir. Koenzim Q10'un da total antioksidan seviyesine etkisi olmadığı gösterilmiştir.

Spermatozoonların plazma membranı ve mitokondriyonlarında çoklu doymamış yağ asitleri içermesi oksidatif strese (OS) karşı duyarlılığını artırır. Bu nedenle spermatozoonların soğutma ve dondurma/çözme işlemleri, reaktif oksijen türlerinin artmasına (total oksidan seviyelerinin de artmasına) ve lipid matriksin yapısına zarar verebilir. Koenzim Q10, antioksidan özelliklerinden dolayı mitokondriyon ve plazma membranlarındaki düşük OS'e neden olmuştur (Yousefian, 2018). Çalışmamızda total oksidan seviyelerine bakıldığında CoQ10'un kontrole göre OS'i arttırmadığı ancak K+CoQ10 grubuna göre daha yüksek seviyelerde total oksidan seviyeleri olduğu belirlenmiştir. Bu sonuca göre kurkuminin bu oksidan seviyelerini normale düşürmüş olabileceği belirlenmiştir. Bunun yanında sadece kurkumin kullanılan grubun oksidan seviyeleri kontrole göre benzerdir.

6. SONUÇLAR

Kriyoprezervasyon, insan ve farklı hayvan türlerinin spermatozoonlarını korumak için rutin olarak kullanılmaktadır. Kriyoprezervasyon sonrası yeterli DNA bütünlüğünün korunması, paternal (baba) genetik bilginin embriyoya güvenli bir şekilde iletilmesi için çok önemlidir. Spermatozoada DNA kırılmalarının varlığı sadece embriyo gelişim aşamalarında değil, aynı zamanda doğumdan sonra çocukluk ve yetişkinlik döneminde ciddi olumsuz etkilere neden olabilir (Aizpurua et al., 2017).

Dondurularak soğutma işlemi sırasında, spermatozoon DNA'sının zarar görebileceği ancak uygun korunma sağlandığı takdirde, spermatozoon çekirdeğinin ovositi aktive etme yeteneğini koruyabildiği ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) ile embriyoların meydana getirilebileceği iyi bilinmektedir. Dondurma/çözme işlemini etkileyen bilinen faktörler (sıcaklık, pH, buz kristal oluşumu vs.) vardır; bunların neden olduğu hasarlarda spermatozoon kalitesini korumak amaçlı güncel araştırmalara ihtiyaç vardır (Olaciregui and Gil, 2017).

Spermatozoonların sıvı azot buharında yapılan kriyoprezervasyonu yöntemiyle dondurulmaları sonucunda, en yüksek canlılık oranlarına sahip oldukları gösterilmiştir (Justice and Christensen, 2013). Bu teknik, diğer kriyoprezervasyon yöntemlerinden daha iyi sonuçlar vermesine rağmen; hücrelerde DNA, kromatin ve akrozom bütünlüğünde hasar oluşturmaktadır (Rahiminia et al., 2017). Kriyoprezervasyon sonrasında hücrelerde, reaktif oksijen radikal (ROS) türlerinin oluştuğu, apoptozisin geliştiği ve antioksidan aktivitenin azaldığı gösterilmiştir (Thomson et al., 2009). Bu durum, dondurma/çözme sonrası spermatozoonların, hasar ve disfonksiyonlarına karşı etkili antioksidan sistemlerin araştırılması gerekliliğini doğurmuştur. Buradan yola çıkarak yaptığımız çalışmada antioksidan maddeler olan kurkumin ve CoQ10'u spermatozoon kriyoprezervasyonunda kullandık.

Sonuçlarımızda kurkumin ve kurkumin+koenzim Q10 gruplarının spermatozoon DNA hasarını arttırdığını, koenzim Q10'un ise özellikle ileri hareketli spermatozoon yüzdesini arttırdığını gösterdik. Literatürde kurkuminin hayvan spermatozoon kriyoprezervasyon çalışmalarında da olumlu etkilerinin olduğu bildirilse

de çalışmamızla karşılaştırıldığında gördüğümüz DNA hasarı varlığı, ileri araştırmalara ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Koenzim Q10'un ise hareketliliği arttırmasının nedeninin açıklanması açısından organel düzeyinde etkisinin ortaya çıkarılması aydınlatıcı olacaktır. Hareketlilikte CoQ10'un özellikle ETZ zerindeki etkin fonksiyonu göz nn alınarak mitokonriyonel aktiviteyi arttırması, kriyoprezervasyonda spermatozoon orta parçasının etkinliğinin belirlenmesine yardımcı olacaktır.



ÖZET

İnsan Semen Kriyoprezervasyonunda Koenzim Q10 ve Kurkuminin Spermatozoon Morfolojisine ve Fonksiyonuna Etkileri

Spermatozoonların sıvı azot buharındaki kriyoprezervasyonu diğer vitrifikasyon yöntemlerinden daha iyi sonuçlar vermesine rağmen hücrelerin hareketlilik, canlılık, akrozom bütünlüğü, DNA ve kromatin yapısında hasar oluşturmaktadır. Oluşan hasar, çiftlerde düşük fertilite oranlarına neden olmaktadır. Kriyoprezervasyondaki bu problemler araştırmacıları farklı sulandırıcı formülasyonların geliştirilmesine örneğin sulandırıcıya çeşitli hormon, vitamin, şeker, antioksidan gibi maddelerin ilave edilmesine yöneltmiştir. Buradan yola çıkarak tezimizde, insan semen örneklerine rutinde kullanılan dondurma medyumuna koenzim Q10 ve kurkumin antioksidanlarını eklemeyi, dondurma/çözme işlemi sonrası medyumların spermatozoonları nasıl etkilediğini değerlendirmeyi, böylece antioksidan moleküllerin insan spermatozoon kriyoprezervasyonundaki hasar oranlarındaki etkisini göstermeyi amaçladık.

Ön deneylerle spermatozoonların kriyoprezervasyon sonrası canlılık ve hareketliliğinin kurkumin 25 mM ve koenzim Q10 25 µM konsantrasyonlarında daha iyi sonuçlar vermesi nedeniyle çalışmaya bu dozlarda devam edilmiştir. Maddeler kullanım kolaylığı açısından ve gliserolde eriyebilirlikleri nedeniyle kriyoprotektan içerisine katılmıştır.

Spermatozoon kriyoprezervasyonunda kurkuminin, hücrelerin hareketlilik ve canlılık parametrelerini kontrol grubuyla benzer şekilde etkilediği tespit edilmiştir. İmmunfloresan ve akım sitometrisi sonucu kurkuminin ve K+CoQ10 gruplarının hücrelerin akrozom bütünlüğüne kontrole göre benzer korunma sağlarken, DNA fragmentasyonunda ciddi artış oluşturdıkları gözlemlenmiştir.

Koenzim Q10, spermatozoon canlılığını kontrol grubuna benzer şekilde etkilerken özellikle CASA (Computer-assisted sperm analysis) sonucu ileri hareketli spermatozoon yüzdesini anlamlı şekilde arttırmıştır. Akrozom bütünlüğü ve DNA fragmentasyonuna belirgin bir etkisi tespit edilmemiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada, insan semen kriyoprezervasyonunda kurkuminin kullanılması hücrelerde DNA hasarına yol açmaktayken koenzim Q10 spermatozoon ileri hareketliliğine olumlu yönde etki etmiştir. Antioksidanların birlikte kullanılması dondurma çözme işleminde artı bir koruyucu etki göstermemiştir. Aksine DNA hasarını arttırmıştır. Literatürde kriyoprezervasyonda olumlu etkilerinin olduğu kurkuminin daha ileri araştırmalara ihtiyacı olduğu görülmektedir. Koenzim Q10'un ise hareketliliği arttırmasının nedeninin açıklanması açısından organel düzeyinde etkisinin araştırılmaya ihtiyacı vardır.

Anahtar Sözcükler: İnsan spermatozoon hücresi, kriyoprezervasyon, antioksidan, kurkumin, koenzim Q10

SUMMARY

The Effects of Coenzyme Q10 and Curcumin on Spermatozoon Morphology and Function in Cryopreservation of Human Semen

Although the cryopreservation of spermatozoa in liquid nitrogen vapor gives better results than other vitrification methods; it damages spermatozoon mobility, viability, acrosome integrity, DNA and chromatin structure. This damage leads to low fertility rates in couples. These problems in cryopreservation have led researchers to develop different diluent formulations, such as addition of various hormones, vitamins, sugars, and antioxidants to the diluent agents. Starting from this point of view in this thesis we aimed to add antioxidants called coenzyme Q10 and curcumin in freezing medium used routinely for human semen samples to evaluate how mediums affect spermatozoon after freezing / thawing processes, and thus we aimed to show the effects of antioxidant molecules on human spermatozoon in damaging rates of cryopreservation.

As the viability and mobility of spermatozoa after cryopreservation gave better results with curcumin at 25 mM and coenzyme Q10 at 25 μ M concentrations in our experiments, we decided to continue with these doses in this work. The substances that are soluble in glycerol and also for easy using added into the cryoprotectant solution.

When compared with the control group, it was determined that curcumin had a similar effect on cell mobility and viability in spermatozoon cryopreservation. With the results of the immunofluorescence and flow cytometry techniques it was observed that curcumin and C + CoQ10 groups provide similar protection to the acrosome integrity of the cells, while they increase DNA fragmentation significantly when compared with the control group.

Coenzyme Q10 affected spermatozoon viability in a similar way to the control group, but the moving forward spermatozoon percentage significantly increased with Coenzyme Q10 especially in the CASA (Computer-assisted sperm analysis) results. No significant effect on acrosome integrity and DNA fragmentation was detected.

In conclusion, using curcumin in human semen cryopreservation leads to DNA damage while coenzyme Q10 positively affected the forward motility of spermatozoon in this study. The combined use of antioxidants did not show an additional protective effect in the freezing and thawing processes. Curcumin which has positive effects on cryopreservation shown in the literature needs further research. In order to explain the reasons of the effect of coenzyme Q10's on spermatozoas increasing mobility, there should be further investigations at the organelle level.

Keywords: Human spermatozoon, cryopreservation, antioxidant, curcumin, coenzyme Q10

KAYNAKLAR

- ABARIKWU, S. O., AKIRI, O. F., DUROJAIYE, M. A. & ALABI, A. F. 2014. Combined administration of curcumin and gallic acid inhibits gallic acid-induced suppression of steroidogenesis, sperm output, antioxidant defenses and inflammatory responsive genes. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 143, 49-60.
- ABDELHAFEZ, F. F., DESAI, N., ABOU-SETTA, A. M., FALCONE, T. & GOLDFARB, J. 2010. Slow freezing, vitrification and ultra-rapid freezing of human embryos: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online*, 20, 209-22.
- AGHAZ, F., KHAZAEI, M., VAISI-RAYGANI, A. & BAKHTIYARI, M. 2018. Cryoprotective effect of sericin supplementation in freezing and thawing media on the outcome of cryopreservation in human sperm. *Aging Male*, 1-8.
- AIZPURUA, J., MEDRANO, L., ENCISO, M., SARASA, J., ROMERO, A., FERNANDEZ, M. A. & GOMEZ-TORRES, M. J. 2017. New permeable cryoprotectant-free vitrification method for native human sperm. *Hum Reprod*, 32, 2007-2015.
- AJINA, T., SALLEM, A., HAOUAS, Z. & MEHDI, M. 2017. Total antioxidant status and lipid peroxidation with and without in vitro zinc supplementation in infertile men. *Andrologia*, 49.
- ALAHMAR, A. T. 2018. The effects of oral antioxidants on the semen of men with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. *Clin Exp Reprod Med*, 45, 57-66.
- AMANN, R. P. & WABERSKI, D. 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. *Theriogenology*, 81, 5-17.e1-3.
- AMIDI, F., PAZHOHAN, A., SHABANI NASHTAEI, M., KHODARAHMIAN, M. & NEKOONAM, S. 2016. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell Tissue Bank*, 17, 745-756.

- AUGER, J., JOUANNET, P. & EUSTACHE, F. 2016. Another look at human sperm morphology. *Hum Reprod*, 31, 10-23.
- BALERCIA, G., MANCINI, A., PAGGI, F., TIANO, L., PONTECORVI, A., BOSCARO, M., LENZI, A. & LITTARRU, G. P. 2009. Coenzyme Q10 and male infertility. *J Endocrinol Invest*, 32, 626-32.
- BARCELOS, I. P. & HAAS, R. H. 2019. CoQ10 and Aging. *Biology (Basel)*, 8.
- BUCAK, M. N., BASPINAR, N., TUNCER, P. B., COYAN, K., SARIOZKAN, S., AKALIN, P. P., BUYUKLEBLEBICI, S. & KUCUKGUNAY, S. 2012. Effects of curcumin and dithioerythritol on frozen-thawed bovine semen. *Andrologia*, 44 Suppl 1, 102-9.
- CARNEIRO, J. A. M., CANISSO, I. F., BANDEIRA, R. S., SCHEEREN, V. F. C., FREITAS-DELL'AQUA, C. P., ALVARENGA, M. A., PAPA, F. O. & DELL'AQUA, J. A., JR. 2018. Effects of coenzyme Q10 on semen cryopreservation of stallions classified as having good or bad semen freezing ability. *Anim Reprod Sci*.
- CHANAPIWAT, P. & KAEOKET, K. 2015. The effect of Curcuma longa extracted (curcumin) on the quality of cryopreserved boar semen. *Anim Sci J*, 86, 863-8.
- COOPER, G. M. 2016. *The Cell: A Molecular Approach*, Sinauer Associates.
- ÇELİK, O. 2011. Yardımcı Üreme Teknikleri Temel Klinik ve Embriyolojik Uygulamalar. Adana.
- DAGHIGH KIA, H., BOLOOKI, Z., VASEGHI DODRAN, H. & MAHDIPOUR, M. 2017. Effect of Adding Coenzyme Q10 and Ellagic Acid during Cryopreservation on Post-Thaw Quality of Ram Semen. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 7, 445-451.
- DI SANTO, M., TAROZZI, N., NADALINI, M. & BORINI, A. 2012. Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. *Adv Urol*, 2012, 854837.

- ELLIOTT, G. D., WANG, S. & FULLER, B. J. 2017. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. *Cryobiology*, 76, 74-91.
- GATIMEL, N., MOREAU, J., PARINAUD, J. & LEANDRI, R. D. 2017. Sperm morphology: assessment, pathophysiology, clinical relevance, and state of the art in 2017. *Andrology*, 5, 845-862.
- GURLER, H., CALISICI, O. & BOLLWEIN, H. 2015. Inter- and intra-individual variability of total antioxidant capacity of bovine seminal plasma and relationships with sperm quality before and after cryopreservation. *Anim Reprod Sci*, 155, 99-105.
- GURRUCHAGA, H., SAENZ DEL BURGO, L., HERNANDEZ, R. M., ORIVE, G., SELDEN, C., FULLER, B., CIRIZA, J. & PEDRAZ, J. L. 2018. Advances in the slow freezing cryopreservation of microencapsulated cells. *J Control Release*, 281, 119-138.
- HEZAVEHEI, M., SHARAFI, M., KOUCHESFAHANI, H. M., HENKEL, R., AGARWAL, A., ESMAEILI, V. & SHAHVERDI, A. 2018. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reprod Biomed Online*.
- JANG, T. H., PARK, S. C., YANG, J. H., KIM, J. Y., SEOK, J. H., PARK, U. S., CHOI, C. W., LEE, S. R. & HAN, J. 2017. Cryopreservation and its clinical applications. *Integrative Medicine Research*, 6, 12-18.
- JANKOWSKI, J., KORZENIOWSKA, K., CIESLEWICZ, A. & JABLECKA, A. 2016. Coenzyme Q10 - A new player in the treatment of heart failure? *Pharmacol Rep*, 68, 1015-9.
- JUSTICE, T. & CHRISTENSEN, G. 2013. Sperm cryopreservation methods. *Methods Mol Biol*, 927, 209-15.
- KIERSZENBAUM, A. L. 2002. *Histology and Cell Biology*, St Louis, United States.

- LAROSA, V. & REMACLE, C. 2018. Insights into the respiratory chain and oxidative stress. *Biosci Rep*, 38.
- LESTARI, M. L. & INDRAYANTO, G. 2014. Curcumin. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol*, 39, 113-204.
- LISLIE P. GARTNER, J. L. H. 2007. *Color Textbook of Histology*, Philadelphia.
- LIU, T., GAO, J., ZHOU, N., MO, M., WANG, X., ZHANG, X., YANG, H., CHEN, Q., AO, L., LIU, J., CUI, Z. & CAO, J. 2016. The effect of two cryopreservation methods on human sperm DNA damage. *Cryobiology*, 72, 210-5.
- MASOUDI, R., SHARAFI, M., ZARE SHAHNEH, A., KOHRAM, H., NEJATI-AMIRI, E., KARIMI, H., KHODAEI-MOTLAGH, M. & SHAHVERDI, A. 2018. Supplementation of extender with coenzyme Q10 improves the function and fertility potential of rooster spermatozoa after cryopreservation. *Anim Reprod Sci*, 198, 193-201.
- NAJAFI, A., ADUTWUM, E., YARI, A., SALEHI, E., MIKAEILI, S., DASHTESTANI, F., ABOLHASSANI, F., RASHKI, L., SHIASI, S. & ASADI, E. 2018. Melatonin affects membrane integrity, intracellular reactive oxygen species, caspase3 activity and AKT phosphorylation in frozen thawed human sperm. *Cell Tissue Res*, 372, 149-159.
- NAZ, R. K. 2014. The Effect of Curcumin on Intracellular pH (pHi), Membrane Hyperpolarization and Sperm Motility. *J Reprod Infertil*, 15, 62-70.
- O'CONNELL, M., MCCLURE, N. & LEWIS, S. E. 2002. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum Reprod*, 17, 704-9.
- OLACIREGUI, M. & GIL, L. 2017. Freeze-dried spermatozoa: A future tool? *Reprod Domest Anim*, 52 Suppl 2, 248-254.

- ORGANISATION, W. H. 2010. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*.
- OZKAVUKCU, S., ERDEMLI, E., ISIK, A., OZTUNA, D. & KARAHUSEYINOGLU, S. 2008. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *J Assist Reprod Genet*, 25, 403-11.
- PAWLINA, W. 2016. *Histology, a text and atlas* Philadelphia.
- PEDRO, P. B., YOKOYAMA, E., ZHU, S. E., YOSHIDA, N., VALDEZ, D. M., JR., TANAKA, M., EDASHIGE, K. & KASAI, M. 2005. Permeability of mouse oocytes and embryos at various developmental stages to five cryoprotectants. *J Reprod Dev*, 51, 235-46.
- PEGG, D. E. 2002. The history and principles of cryopreservation. *Semin Reprod Med*, 20, 5-13.
- RAHIMINIA, T., HOSSEINI, A., ANVARI, M., GHASEMI-ESMAILABAD, S. & TALEBI, A. R. 2017. Modern human sperm freezing: Effect on DNA, chromatin and acrosome integrity. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 56, 472-476.
- SALEHI, B., STOJANOVIC-RADIC, Z., MATEJIC, J., SHARIFI-RAD, M., ANIL KUMAR, N. V., MARTINS, N. & SHARIFI-RAD, J. 2018. The therapeutic potential of curcumin: A review of clinical trials. *Eur J Med Chem*, 163, 527-545.
- SHAH, S. A. H., ANDRABI, S. M. H. & QURESHI, I. Z. 2017. Freezability of water buffalo bull (*Bubalus bubalis*) spermatozoa is improved with the addition of curcumin (diferuoyl methane) in semen extender. *Andrologia*, 49.
- SHUKLA, S. & DUBEY, K. K. 2018. CoQ10 a super-vitamin: review on application and biosynthesis. *3 Biotech*, 8, 249.

- SIEME, H., OLDENHOF, H. & WOLKERS, W. F. 2015. Sperm Membrane Behaviour during Cooling and Cryopreservation. *Reprod Domest Anim*, 50 Suppl 3, 20-6.
- SIEME, H., OLDENHOF, H. & WOLKERS, W. F. 2016. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Anim Reprod Sci*, 169, 2-5.
- SOLEIMANZADEH, A. & SABERIVAND, A. 2013. Effect of curcumin on rat sperm morphology after the freeze-thawing process. *Vet Res Forum*, 4, 185-9.
- SOOD, B. & WHITTEN, R. 2018. Coenzyme Q10. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing StatPearls Publishing LLC.
- SUN, J., CHEN, F., BRAUN, C., ZHOU, Y. Q., RITTNER, H., TIAN, Y. K., CAI, X. Y. & YE, D. W. 2018. Role of curcumin in the management of pathological pain. *Phytomedicine*, 48, 129-140.
- THOMSON, L. K., FLEMING, S. D., AITKEN, R. J., DE IULIIS, G. N., ZIESCHANG, J. A. & CLARK, A. M. 2009. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Hum Reprod*, 24, 2061-70.
- VALVERDE, A., MADRIGAL, M., CALDEIRA, C., BOMPART, D., DE MURGA, J. N., ARNAU, S. & SOLER, C. 2019. Effect of frame rate capture frequency on sperm kinematic parameters and subpopulation structure definition in boars, analysed with a CASA-Mot system. *Reprod Domest Anim*, 54, 167-175.
- WAFI, W. 2016. *Effect of Coenzyme Q10 as an Antioxidant Added to Semen Extender During Cryopreservation of Buffalo and Cattle Semen*.
- WANG, S., WANG, W., XU, Y., TANG, M., FANG, J., SUN, H., SUN, Y., GU, M., LIU, Z., ZHANG, Z., LIN, F., WU, T., SONG, N., WANG, Z., ZHANG, W. & YIN, C. 2014. Proteomic characteristics of human sperm cryopreservation. *Proteomics*, 14, 298-310.

- XU, X. Y., MENG, X., LI, S., GAN, R. Y., LI, Y. & LI, H. B. 2018. Bioactivity, Health Benefits, and Related Molecular Mechanisms of Curcumin: Current Progress, Challenges, and Perspectives. *Nutrients*, 10.
- YOUSEFIAN, I., ZARE SHAHNEH, A. & ZHANDI, M. 2014. *The Effect of Coenzyme Q10 and α -Tocopherol in Skim Milk-Based Extender for Preservation of Caspian Stallion Semen in Cool Condition.*
- YOUSEFIAN, I. E., M. KARAMZADEH-DEHAGHANI, A. SABZIAN-MELEI, R. ZHANDI, M. ZARE-SHAHNEH, A. 2018. Attenuation of cryopreservation-induced oxidative stress by antioxidant: Impact of Coenzyme Q10 on the quality of post-thawed buck spermatozoa. *Cryobiology*.
- YURCHUK, T., PETRUSHKO, M. & FULLER, B. 2018. Science of cryopreservation in reproductive medicine - Embryos and oocytes as exemplars. *Early Hum Dev.*
- ZHANG, L., DIAO, R. Y., DUAN, Y. G., YI, T. H. & CAI, Z. M. 2017. In vitro antioxidant effect of curcumin on human sperm quality in leucocytospermia. *Andrologia*, 49.
- ZINI, A., SAN GABRIEL, M. & BAAZEEM, A. 2009. Antioxidants and sperm DNA damage: a clinical perspective. *J Assist Reprod Genet*, 26, 427-32.